

# HYDROPHOBIC CHROMATOGRAPHIC RESINS WITH IONIZABLE GROUPS

Publication number: JP10502339 (T)

Publication date: 1998-03-03

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- International:

B01J20/28; B01J20/281; B01J20/286; B01J20/287;  
B01J20/289; B01J20/32; C07K1/16; C07K1/18; C07K1/20;  
C07K1/702; C12N9/50; C12N9/56; C12N9/64; G01N30/88;  
B01J20/28; B01J20/281; B01J20/30; C07K1/00;  
C07K1/700; C12N9/50; C12N9/52; C12N9/64; G01N30/00;  
(IPC1-7): B01J20/26; C07K1/16; C07K1/702; C12N9/56;  
C12N9/64; G01N30/48; G01N30/88

- European:

B01J20/286; B01J20/287; B01J20/289; B01J20/32;  
C07K1/18; C07K1/20; C12N9/50; G01N30/48A

Application number: JP19950502867T 19950623

Priority number(s): WO1995B00598 19950623; US19940268178 19940629

Also published as:

WO9600735 (A1)  
AU682780 (B2)  
AU2935495 (A)  
US2004214157 (A1)  
FI965233 (A)

more >>

Abstract not available for JP 10502339 (T)

Abstract of corresponding document: WO 9600735 (A1)

Disclosed are resins, resin-protein/peptide complexes and methods for purifying proteins and peptides using said resins. The resins described herein are useful for the binding of a selected protein or peptide, particularly from an aqueous medium such as a fermentation broth, by hydrophobic interactions between the resin and the selected protein or peptide. The resin is characterized by the fact that it contains ionizable ligands and/or functionalities which are uncharged at the pH of binding the target protein or peptide, thereby facilitating hydrophobic interactions, and charged at the pH of desorption, thereby disrupting the established hydrophobic interaction between the resin and the target protein or peptide. More particularly, the present invention is directed to the use of the described resins in the purification of recombinant enzyme products such as proteases, for example, chymosin or subtilisin.

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

特表平10-502339

(43) 公表日 平成10年(1998) 3月3日

| (51) Int.Cl. <sup>4</sup>         | 識別記号 | 序内整理番号  | F I           |   |
|-----------------------------------|------|---------|---------------|---|
| C 0 7 K 17/02                     |      | 9356-4H | C 0 7 K 17/02 |   |
| B 0 1 J 20/26                     |      | 9729-4D | B 0 1 J 20/26 | L |
| C 0 7 K 1/16                      |      | 9356-4H | C 0 7 K 1/16  |   |
| C 1 2 N 9/56                      |      | 9152-4B | C 1 2 N 9/56  |   |
|                                   | 9/64 | 9152-4B | 9/64          | Z |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 65 頁) 最終頁に続く |      |         |               |   |

|               |   |          |  |
|---------------|---|----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願平8-502987   | (71) 出願人 | マッセイ ユニヴァーシティー                             |
| (86) (22) 出願日 | 平成7年(1995) 6月23日  |          | ニュージーランド国 バルマーストン ノース 5331                 |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成8年(1996) 12月27日   | (72) 発明者 | パートン, シモン シー                               |
| (86) 国際出願番号   | P C T / I B 9 5 / 0 0 5 9 8   |          | ニュージーランド国 バルマーストン ノース 5331 マッセイ ユニヴァーシティー内 |
| (87) 国際公開番号   | W O 9 6 / 0 0 7 3 5   | (72) 発明者 | ハーディング, デヴィッド アール ケー                       |
| (87) 国際公開日    | 平成8年(1996) 1月11日  |          | ニュージーランド国 バルマーストン ノース 5331 マッセイ ユニヴァーシティー内 |
| (31) 優先権主張番号  | 0 8 / 2 6 8, 1 7 8  | (74) 代理人 | 弁理士 柳田 征史 (外1名)                            |
| (32) 優先日      | 1994年6月29日  |          | 最終頁に続く                                     |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)   |          |  |
| (81) 指定国      | EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, FI, JP, M X, NZ |          |  |

(54) 【発明の名称】 イオン化可能原子団を有する疎水性クロマトグラフィー用樹脂

## (57) 【要約】

開示されているのは、樹脂、樹脂-タンパク質/ペプチド複合体、および、タンパク質およびペプチドの前記樹脂を用いた精製方法である。ここに記載されている樹脂は、特に発酵培地などの水性培地からの、樹脂と選択されたタンパク質またはペプチドとの間の疎水性相互作用による選択されたタンパク質またはペプチドの結合に有用である。この樹脂は、標的タンパク質またはペプチドの、結合 pH では静電的に荷電しておらず、それにより疎水性相互作用を形成させ、放出 pH では荷電し、それにより形成された樹脂と標的タンパク質またはペプチドとの間の疎水性相互作用を崩壊させるイオン化可能リガンドおよび/または官能基を有するという事実により特徴づけられる。さらに詳細には、本発明は上記の樹脂を、スプチリシンまたはキモシン等のプロテアーゼ等の組換え酵素産物の精製において使用するものである。

## 【特許請求の範囲】

1. 樹脂とそれに結合した標的タンパク質またはペプチドとを含む樹脂-タンパク質/ペプチド複合体であり、前記樹脂が、

a) 固体支持マトリックス; および

b) 共有結合により前記樹脂に取り付けられた選択されたイオン化可能リガンドからなり、前記イオン化可能リガンドが、前記樹脂が、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂から放出されるpHにおいては静電的に荷電しているよう選択されており、さらに水性培地が高または低いずれのイオン強度を有している場合においても、前記水性培地中の前記標的タンパク質またはペプチドの約50%以上が前記樹脂に吸着することの特徴とする複合体。

2. 前記イオン化可能リガンドが、前記樹脂が、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂から放出されるpHにおいては正に荷電していることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

3. 前記イオン化可能リガンドが、前記樹脂が、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂から放出されるpHにおいては負に荷電していることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

4. 前記イオン化可能リガンドが、前記固体支持マトリックスに直接取り付けられたイオン化可能官能基を有することを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

5. 前記イオン化可能リガンドが、1のスペーサーおよび少なくとも1のイオン化可能官能基を有し、前記イオン化可能官能基が前記固体支持マトリックスに前記スペーサーを介して取り付けられていることを特徴とする請求の範囲第1

項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

6. 前記固体支持マトリックスが、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と結合するpHにおいてはプロトン化されており、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂から放出されるpHにおいては脱プロトン化されて負に荷電しているカルボキシル基により官能基化されていることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

7. 前記樹脂がさらに非イオン化性リガンドを含んでいることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

8. 前記固体支持マトリックスに取り付けられた非イオン化性リガンドのパーセンテージが、イオン化可能または非イオン化性リガンドの全体の0%より大きく約80%迄の範囲にあることを特徴とする請求の範囲第7項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

9. 前記固体支持マトリックスに取り付けられた非イオン化性リガンドのパーセンテージが、イオン化可能または非イオン化性リガンドの全体の0%より大きく約40%迄の範囲にあることを特徴とする請求の範囲第8項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

10. 前記固体支持マトリックスが架橋結合されていることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

11. 前記樹脂が、いかなるイオン化可能リガンドをも取り付ける以前の前記固体支持マトリックス1mlあたり、約0.05mmolから約0.5mmolのイオン化可能リガンドを有することを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

12. 前記固体支持マトリックスが非イオン化性であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

13. 前記固体支持マトリックスがイオン化可能官能基を有し、前記官能基が、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂から放出されるpHにおいては静電的に荷電していることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

14. 前記樹脂-タンパク質/ペプチド複合体の前記樹脂上に誘導される前記静電的電荷が前記標的タンパク質またはペプチドの放出pHにおける正味電荷と同じ極性であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

15. 前記樹脂-タンパク質/ペプチド複合体の前記樹脂上に誘導される前記静電的電荷が前記標的タンパク質またはペプチドの放出pHにおける正味電荷と反対の極性であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

16. 樹脂とそれに結合した標的タンパク質またはペプチドとを含む樹脂-タンパク質/ペプチド複合体であり、前記樹脂が、

a) 骨格中に取り込まれた選択されたイオン化可能官能基を有する固体支持マトリックスで、そこにおいて前記イオン化可能官能基が、前記樹脂が、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂から放出されるpHにおいては静電的に荷電しているよう選択されているもの；および

b) 必要に応じて、共有結合によりそれに取り付けられた1つの非イオン化性リガンドからなり、水性培地が高または低いずれのイオン強度を有している場合においても、前記水性培地中の前記標的タンパク質またはペプチドの約50%以上が前記樹脂に吸着することを特徴とする複合体。

17. 前記イオン化可能官能基が、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂から放出されるpHにおいては正に荷電していることを特徴とする請求の範囲第16項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

18. 前記イオン化可能官能基が、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂から放出されるpHにおいては負に荷電していることを特徴とする請求の範囲第16項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

19. 前記イオン化可能官能基が、前記固体支持マトリックスの骨格中に共有結合

により取り付けられたアミノ基を有することを特徴とする請求の範囲第16項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

20. 前記固体支持マトリックスが架橋結合されていることを特徴とする請求の範囲第16項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

21. 前記樹脂が、前記固体支持マトリックス1mlあたり約0.05mmolから約0.5mmolの非イオン化性リガンドを含むことを特徴とする請求の範囲第16項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

22. 前記樹脂-タンパク質/ペプチド複合体の前記樹脂上に誘導される前記静電的電荷が前記標的タンパク質またはペプチドの放出pHにおける正味電荷と同じ極性であることを特徴とする請求の範囲第16項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

23. 前記樹脂-タンパク質/ペプチド複合体の前記樹脂上に誘導される前記静電的電荷が前記標的タンパク質またはペプチドの放出pHにおける正味電荷と反対の極性であることを特徴とする請求の範囲第16項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体。

24. 標的タンパク質またはペプチドを前記標的タンパク質またはペプチドを含む水性培地から結合および回収する方法であって、以下の工程：

a) 前記標的タンパク質またはペプチドが樹脂と結合するために十分な条件下で、前記培地を前記樹脂と接触させるが、ここにおいて、前記樹脂は、固体支持マトリックスおよび前記マトリックスに共有結合により取り付けられた選択されたイオン化可能リガンドを含み、前記イオン化可能リガンドは、前記樹脂が、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂から放出されるpHにおいては静電的に荷電するよう選択されており、さらに水性培地が高または低いいずれのイオン強度を有している場合においても、前記水性培地中の前記標的タンパク質またはペプチドの約50%以上が前記樹脂に吸着し、

b) 樹脂-タンパク質/ペプチド複合体を形成するために、結合した前記標的タンパク質またはペプチドを前記培地の他の組成物から前記樹脂を分離し、

；および

c) 誘導された電荷がその溶液のpHでの前記標的タンパク質またはペプチドの正味電荷と同じ極性である、前記樹脂上に静電的電荷を誘導可能なpHを有する放出溶液と前記複合体とを接触させ、前記結合した標的タンパク質またはペプチドを前記複合体から放出させる

各工程を含むことを特徴とする方法。

25. 標的タンパク質またはペプチドを前記標的タンパク質またはペプチドを含む水性培地から結合および回収する方法であって、以下の工程：

a) 前記標的タンパク質またはペプチドが樹脂と結合するために十分な条件下で、前記培地を前記樹脂と接触させるが、ここにおいて、前記樹脂は、固体支持マトリックスおよび前記マトリックスに共有結合により取り付けられた選択されたイオン化可能リガンドを含み、前記イオン化可能リガンドは、前記樹脂が、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂から放出されるpHにおいては静電的に荷電するよう選択されており、さらに水性培地が高または低いずれのイオン強度を有している場合においても、前記水性培地中の前記標的タンパク質またはペプチドの約50%以上が前記樹脂に吸着し、

b) 樹脂-タンパク質/ペプチド複合体を形成するために、結合した前記標的タンパク質またはペプチドを前記培地の他の組成物から前記樹脂を分離し、

；および

c) 誘導された電荷がその溶液のpHでの前記標的タンパク質またはペプチドの正味電荷と反対の極性である、前記樹脂上に静電的電荷を誘導可能なpHを有する放出溶液と前記複合体とを接触させ、前記結合した標的タンパク質またはペプチドを前記複合体から放出させる

各工程を含むことを特徴とする方法。

26. 前記樹脂上に誘導された電荷が正電荷であることを特徴とする請求の範囲第24または25項記載の方法。

27. 前記樹脂上に誘導された電荷が負電荷であることを特徴とする請求の範囲第

- 24または25項記載の方法。
28. 前記水性培地を攪拌バッチ工程において前記樹脂と接触させることを特徴とする請求の範囲第24または25項記載の方法。
29. 前記水性培地をクロマトグラフィーカラムにおいて前記樹脂と接触させることを特徴とする請求の範囲第24または25項記載の方法。
30. 前記水性培地を液体化拡張ベッドにおいて前記樹脂と接触させることを特徴とする請求の範囲第29項記載の方法。
31. 前記カラムが放射状流体カラムであることを特徴とする請求の範囲第29項記載の方法。
32. 前記水性培地が粗発酵液体培地であることを特徴とする請求の範囲第24または25項記載の方法。
33. 前記粗発酵液体培地がキモシンおよびスプテリシンからなる群より選択されたタンパク質を含むことを特徴とする請求の範囲第32項記載の方法。
34. 前記標的タンパク質またはペプチドの結合を、2から12のpHで行うことを特徴とする請求の範囲第24または25項記載の方法。
35. 前記標的タンパク質またはペプチドの結合を、5から9のpHで行うことを特徴とする請求の範囲第24または25項記載の方法。
36. 前記標的タンパク質またはペプチドの放出を、前記標的タンパク質またはペプチドを樹脂に結合させるために用いられたpHとは異なる2から12の範囲内のpHで行うことを特徴とする請求の範囲第34項記載の方法。
37. 前記標的タンパク質またはペプチドの放出を、前記標的タンパク質またはペプチドを樹脂に結合させるために用いられたpHとは異なる5から9の範囲内のpHで行うことを特徴とする請求の範囲第35項記載の方法。
38. 前記水性混合物のpHが約pH2からpH12の範囲に、前記水性混合物を前記樹脂と接触させる前に調節されていることを特徴とする請求の範囲第34項記載の方法。
39. 標的タンパク質またはペプチドを前記標的タンパク質またはペプチドを含む水性培地から結合および回収する方法であって、以下の工程：
- a) 前記標的タンパク質またはペプチドが樹脂と結合するために十分な条件下



で、前記培地を前記樹脂と接触させるが、ここにおいて、前記樹脂は、前記樹脂が前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂から放出されるpHにおいては静電的に荷電するよう選択されたイオン化可能官能基を骨格中に有する固体支持マトリックスを含むんでおり、さらに水性培地が高または低いいずれのイオン強度を有している場合においても、前記水性培地中の前記標的タンパク質またはペプチドの約50%以上が前記樹脂に吸着し、

b) 樹脂-タンパク質/ペプチド複合体を形成するために、結合した前記標的タンパク質またはペプチドを前記培地の他の組成物から前記樹脂を分離し、

; および

c) 誘導された電荷がその溶液のpHでの前記標的タンパク質またはペプチドの正味電荷と同じ極性である、前記樹脂上に静電的電荷を誘導可能なpHを有する放出溶液と前記複合体とを接触させ、前記結合した標的タンパク質またはペプチドを前記複合体から放出させる

各工程を含むことを特徴とする方法。

40. 標的タンパク質またはペプチドを前記標的タンパク質またはペプチドを含む水性培地から結合および回収する方法であって、以下の工程:

a) 前記標的タンパク質またはペプチドが樹脂と結合するために十分な条件下で、前記培地を前記樹脂と接触させるが、ここにおいて、前記樹脂は、前記樹脂が前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂から放出されるpHにおいては静電的に荷電するよう選択されたイオン化可能官能基を骨格中に有する固体支持マトリックスを含むんでおり、さらに水性培地が高または低いいずれのイオン強度を有している場合においても、前記水性培地中の前記標的タンパク質またはペプチドの約50%以上が前記樹脂に吸着し、

b) 樹脂-タンパク質/ペプチド複合体を形成するために、結合した前記標的タンパク質またはペプチドを前記培地の他の組成物から前記樹脂を分離し、

; および

c) 誘導された電荷がその溶液のpHでの前記標的タンパク質またはペプチドの正味電荷と反対の極性である、前記樹脂上に静電的電荷を誘導可能なpHを有する放出溶液と前記複合体とを接触させ、前記結合した標的タンパク質またはペプチドを前記複合体から放出させる

各工程を含むことを特徴とする方法。

41. 前記樹脂上の誘導された電荷が正電荷であることを特徴とする請求の範囲第39または40項記載の方法。

42. 前記樹脂上の誘導された電荷が負電荷であることを特徴とする請求の範囲第39または40項記載の方法。

43. 前記水性培地を攪拌バッチ工程により前記樹脂と接触させることを特徴とする請求の範囲第39または40項記載の方法。

44. 前記水性培地をクロマトグラフィーカラムにおいて前記樹脂と接触させることを特徴とする請求の範囲第39または40項記載の方法。

45. 前記水性培地を液体化ベッドにおいて前記樹脂と接触させることを特徴とする請求の範囲第44項記載の方法。

46. 前記カラムが放射状流体カラムであることを特徴とする請求の範囲第44項記載の方法。

47. 前記水性培地が粗発酵液体培地であることを特徴とする請求の範囲第39または40項記載の方法。

48. 前記粗発酵液体培地がキモシンおよびスブチリシンからなる群より選択されたタンパク質を含むことを特徴とする請求の範囲第47項記載の方法。

49. 前記標的タンパク質またはペプチドの結合を、2から12のpHで行うことを特徴とする請求の範囲第39または40項記載の方法。

50. 前記標的タンパク質またはペプチドの結合を、5から9のpHで行うことを特徴とする請求の範囲第39または40項記載の方法。

51. 前記標的タンパク質またはペプチドの放出を、前記標的タンパク質またはペプチドを樹脂に結合させるために用いられたpHとは異なる2から12の範囲内のpHで行うことを特徴とする請求の範囲第49項記載の方法。

52. 前記標的タンパク質またはペプチドの放出を、前記標的タンパク質またはペプチドを樹脂に結合させるために用いられたpHとは異なる5から9の範囲内のpHで行うことを特徴とする請求の範囲第50項記載の方法。

53. 前記水性混合物のpHが約pH2からpH12の範囲に、前記水性混合物を前記樹脂と接触させる前に調節されていることを特徴とする請求の範囲第49項記載の方法。

54. 標的タンパク質またはペプチドを、前記標的タンパク質またはペプチドを含む水性培地から分離するための方法であって、前記培地を樹脂と、前記標的タンパク質またはペプチドが前記樹脂と請求の範囲第1項から第16項何れか1項記載の樹脂-タンパク質/ペプチド複合体を形成するように結合させるために十分な条件下で接触させることを特徴とする方法。

## 【 発明の詳細な説明 】

イオン化可能原子団を有する疎水性クロマトグラフィー用樹脂

## 発明の背景

## 発明の分野

本発明は、タンパク質およびペプチドとクロマトグラフィー用樹脂との複合体、およびそのような樹脂を用いたタンパク質またはペプチドの精製方法に関する。特に、ここに記述されているクロマトグラフィー用の樹脂は、選択されたタンパク質またはペプチドの、特に、発酵液体培地等の水性培地からの、標的とするタンパク質またはペプチドとの間の相互作用による結合に有用である。本樹脂は、標的タンパク質またはペプチドの結合 pH では静電的に荷電しておらず、それにより疎水性相互作用を形成させ、放出 pH では荷電し、それにより形成された樹脂と標的タンパク質またはペプチドとの間の疎水性相互作用を崩壊させるイオン化官能基を有するという事実により特徴づけられる。

参考文献

以下の参考文献が明細書中で [ ] 内の番号で参照されている。

- 1 Ochoa, J.L., "Hydrophobic (interaction) chromatography", *Biochimie*, 60:1-15 (1978).
- 2 Yon, R.J., et al., "Protein Chromatography on Adsorbents with Hydrophobic and Ionic Groups", *Biochem J.*, 151:281-290 (1975).
- 3 Yon R. J., "Chromatography of Lipophilic Proteins on Adsorbents Containing Mixed Hydrophobic and Ionic Groups", *Biochem J.*, 126:765-767 (1972).
- 4 Hofstee, B.H.J., "Hydrophobic Affinity Chromatography of Proteins", *Anal. Biochem.*, 52:430-448 (1973).

- 5 Hoftsee, B.H.J., "Protein Binding by Agarose Carrying Hydrophobic Groups in Conjunction with Charges", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**:751-757 (1973).
- 6 Jost, R. et al., "The Mode of Adsorption of Proteins to Aliphatic and Aromatic Amines Coupled to Cyanogen Bromide-Activate Agarose", *Biochem. Biophys.*, **362**:75-82 (1974).
- 7 Kasche V., et al., "Rapid Protein Purification Using Phenylbutylamine-Eupergit: a novel method for large-scale procedures", *J Chromatogr.*, **510**: 149-154 (1990).
- 8 Sasaki I. et al., "Hydrophobic-Ionic Chromatography", *J. Biochem.*, **86**:1537-1548 (1979).
- 9 Sasaki I. et al., "Hydrophobic-Ionic Chromatography: Its Application to Microbial and Glucose Oxidase, Hya'uronidase, Cholesterol Oxidase, and Cholesterol Esterase", *J. Biochem.*, **91**:1555-1561 (1982).
- 10 Simons, P. C. et al., "Purification of Glutathione S-Transferases from Human Liver by Glutathione-Affinity Chromatography", *Anal. Biochem.*, **82**:334-341 (1977).
- 11 Asenjo, J.A. et al., "Rational Design of Purification Processes for Recombinant Proteins", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **646**:334-356 (1991).
- 12 Butler, L.G., "Enzyme Immobilization by Adsorption on Hydrophobic Derivatives of Cellulose and Other Hydrophilic Materials", *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**:645-650 (1975).
- 13 Caldwell, K.D. et al., "Utilization of Hydrophobic Interaction for the Formation of an Enzyme Reactor Bed", *Biotechnol. Bioeng.*, **17**:613-616 (1975).
- 14 Cashion, P. et al., "Enzyme Immobilization on Tritylagarose", *Biotech. Bioeng.*, **24**:403-423 (1982).
- 15 Voutsinas, P.L. et al., "Coagulation of Skim Milk with Proteases Immobilized on Hydrophobic Carriers", *Dairy Sci.*, **66**:694-703 (1983).
- 16 Hutchinson, D.W., "The Preparation and Properties of Immobilized Dipeptidyl-aminopeptidase I (cathepsin C)", *Biochim. Biophys. Acta*, **916**:1-4 (1987).

- 17 Ruaan, R.C. et al., "Dual-Functional Affinity Protein Purification", *Biotechnol. Prog.*, 4:107-112 (1988).
- 18 Teichberg, V.I., "Affinity-Repulsion Chromatography", *J. Chromatogr.*, 510:49-57 (1990).
- 19 Johansson, G. et al., "Affinity Partition Between Aqueous Phases - A Tool for Large-Scale Purification of Enzymes", *J. Biotechnol.*, 11:135-142 (1989).
- 20 Ortin, A. et al., "Large Scale Extraction of a  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin from Bovine Whey by Precipitation with Polyethylene Glycol and Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems", *Prep. Biochem.*, 22:53-66 (1992).
- 21 Heath, C.A. et al., "Synthetic Membranes in Biotechnology: Realities and Possibilities", *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 47:45-88 (1992).
- 22 Luong, J.H.T. et al., "Synthesis and Characterization of a Water-Soluble Affinity Polymer for Trypsin Purification", *Biotechnol. Bioeng.*, 31:439-446 (1988).
- 23 Champluvier, B. et al., "Dye-Ligand Membranes as Selective Adsorbents for Rapid Purification of Enzymes: A Case Study", *Biotechnol. Bioeng.*, 40: 33-40 (1992).

上記の刊行物の各々の開示は、各々の、および全ての文献が独立してここに取り込まれているのと同程度に、それら全体として参考文献としてここに取り込まれている。

#### 技術の現状

近年、選択されたタンパク質またはペプチドを、水性混合物からの分離および精製を可能とするための幾つかの技術が開発および／または最適化されてきた。このような技術の開発は、部分的には、組換えにより開発された、所望のタンパク質またはペプチドを発酵液体培地中に発現するよう遺伝的に改変された微生物の増殖に対応するものである。しかしながら、このような液体培地は、所望のタンパク質またはペプチドのみならず、微生物によって発現された多様なタンパク質またはペプチド並びに、例えば標的タンパク質またはペプチドが細胞外に発現された場合は細胞全体、および標的タンパク質またはペプチドが細胞内に発現さ

れ標的のタンパク質またはペプチドを水性培地中に取り出すために細胞の溶解が

必要である場合は細胞のデブリ等を含む混在物を含むという特徴を有している。

これまでのタンパク質／ペプチドに対して用いられた分離および精製技術は、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよびその様なものを含む。その様なクロマトグラフィー技術の多様性は、選択されたタンパク質またはペプチドを変性させずに、その一方で分離／精製工程の複雑さを最小にしながら、分離および／または精製を改善することの難しさを反映しており、上述の各々の技術は、それらの産業的規模での幅広い使用を制限している1以上の欠点に苦しんでいる。

例えば、イオン交換クロマトグラフィーにおいては、タンパク質またはペプチドと樹脂との間の良好な結合のためには、タンパク質またはペプチド溶液は、最初に、典型的には希釈、透析、ダイアフィルトレーション、ゲル濾過等により脱塩されていることが要求される。さらには、結合させたタンパク質またはペプチドの樹脂からの除去を改善するには、典型的には、高塩濃度の水溶液を樹脂と接触させる。

疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）においては、樹脂は理想的には荷電しておらず、結合は疎水性相互作用のみによる。このような樹脂に対するタンパク質またはペプチドの結合を改善するには、タンパク質またはペプチド溶液は、典型的には高イオン強度である[1]。例えば、硫酸アンモニウムまたは塩化ナトリウムの、モル濃度で1 M以上の大量の塩を、要求される高イオン強度を達成するために、タンパク質またはペプチドの溶液に典型的には添加する。結合後、結合したタンパク質またはペプチドは典型的には脱塩により回収される。

タンパク質またはペプチド溶液の加塩／脱塩に関与するクロマトグラフィー技術は、産業的規模では取量を改善するために大量の試薬の使用を要求し、またかなりの工程を必要とする。従って、疎水性相互作用クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーは、産業的な量で、発酵液体培地またはその他の水性培地からのタンパク質またはペプチドを回収または精製するための、最も効率的でコストパフォーマンスに優れた方法ではない。

同様に、アフィニティークロマトグラフィーを選択されたタンパク質またはペ

アチドの分離／精製の実行に利用することは、要求される厳密な工程の条件、低い処理量およびこの技術の高コストにより、範囲が限られている。従って、この工程は典型的には、産業的な量でのタンパク質またはペプチドの発酵液体培地またはその他の水性培地からの効率的な回収には馴染まない。

本発明は、発酵液体培地を含む水性培地からのタンパク質またはペプチドの、驚くべきかつ効率的な大容量の回収および／または精製を可能とする特定のクロマトグラフィー用樹脂の使用に関するものである。ここで用いられる樹脂は、固体支持マトリックスおよびそれに共有結合で取り付けられたリガンドを含み、当該樹脂は標的タンパク質またはペプチドが樹脂に結合している pH においては静電的に荷電しておらず、タンパク質またはペプチドが樹脂から溶出される pH においては静電的に荷電していることを特徴とする。ここに記述される樹脂はさらに、高または低何れのイオン強度で維持されている溶液からも標的タンパク質またはペプチドを結合させることができることを特徴とする。

好ましい実施態様においては、タンパク質またはペプチドを放出する pH での樹脂上の誘導された静電的電荷は、放出 pH での標的タンパク質またはペプチドの正味電荷と同じ極性を有する。この実施態様においては、放出は、樹脂の疎水結合性を打ち消す電荷－電荷反発によりなされる。別の実施態様においては、誘導された静電的電荷は標的タンパク質またはペプチドのそれとは反対の極性を有する。いずれの実施例においても、放出は、高イオン強度の溶出剤の使用により、またはプロピレングリコール等の極性減少剤の使用により実現される。

本発明の、樹脂－タンパク質／ペプチド複合体は、これまでに記述された樹脂－タンパク質／ペプチド複合体とは、樹脂は、タンパク質結合 pH では静電的に荷電しておらず、放出 pH では荷電しているという特徴により対照を成す。特に、HIC の場合は、荷電した原子団を、長鎖アルキル鎖（疎水性）セファロー樹脂への強力な結合を弱め、より好ましい放出条件とするために熟慮したうえで導入した〔2、3〕。これらのマトリックスは正に荷電したイソ尿素結合および負に荷電したカルボキシル基を含み、すべての pH において荷電した官能基を有する。

ポリスチレンカルボキシル樹脂 (Amberlite) を疎水性相互作用による



タンパク質結合のために用いた〔8、9〕。pHが4.5で荷電していない型にあるといわれていたが〔8、9〕、滴定実験により、このマトリックスはpH3以下の時のみ荷電していないことが判明した。このシステムにおいては、タンパク質は約4.5で結合し、pHの増加により溶出されたが、さらに荷電マトリックスカルボキシル基を脱プロトン化し、疎水性を弱めた。いくつかの場合においては、これにより、異なったタンパク質の等電点(IEP)をすぎるときに静電的反発が起こった。この方法は狭いpH範囲でのみ有効である〔9〕。

同様に開示されているのは、イソ尿素原子団を有する正に荷電した樹脂である〔4、5〕。これらのマトリックスは弱く疎水性であり、典型的には、タンパク質またはペプチドの樹脂への結合のための静電的および疎水性相互作用を要求する。さらに、これらの樹脂中の荷電した原子団は、樹脂表面ではなく固体支持マトリックスに近接しており、pHの変化はタンパク質またはペプチドの樹脂からの放出には用いられていない。カラムからのタンパク質またはペプチドの放出は、荷電した場合は、荷電していない樹脂が用いられた場合と比較してより容易である〔6〕。荷電した原子団はフェニルブチルアミン樹脂からの放出を実行するときに放出能力を制限するものではないことが示された〔7〕。吸着は疎水性相互作用に帰せられる。しかしながら、荷電した官能基を、タンパク質またはペプチドの結合および続いて樹脂からの放出に利用することは、典型的には、結合に先立って、または放出を行うために、溶液のイオン強度を調整することを必要とする。このような調整はタンパク質またはペプチドの回収および/または精製を実行するための効率的な工程とは一致しない。

#### 発明の概要

本発明は樹脂とタンパク質およびペプチドとの複合体およびそのような樹脂を用いた標的タンパク質またはペプチドの精製方法に関する。ここに記述される樹脂はイオン化可能な官能基および固体マトリックスを有し、そして前記樹脂は標的タンパク質またはペプチドが樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、放出のpHにおいては静電的に荷電しているものである。結合pHでの電荷の欠如により、例えば、イオン交換樹脂等に関連した困難さおよび/または複雑さを回避することができる。

上記の観点より、その組成物の態様としては、本発明は、樹脂およびそれに結合した標的タンパク質またはペプチドからなる樹脂-タンパク質/ペプチド複合体であり、当該樹脂は、

- a) 固体支持マトリックス；および
- b) マトリックスに共有結合で取り付けられた選択されたイオン化可能リガンドを含み、そこにおいて当該イオン化可能リガンドは、前記樹脂が前記標的タンパク質またはペプチドが当該樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、該標的タンパク質またはペプチドが当該樹脂から放出されるpHにおいては静電的に荷電しているように選択され、さらに水性培地が高または低いいずれのイオン強度を有している場合においても、水性培地中の標的タンパク質またはペプチドの約40%、好ましくは50%以上が前記樹脂に吸着するものである。

その組成物としての別の態様においては、本発明は樹脂およびそれに結合した標的タンパク質またはペプチドからなる樹脂-タンパク質/ペプチド複合体であり、当該樹脂は、

- a) 自身の骨格に取り込まれた、選択されたイオン化可能官能基を有する固体支持マトリックスであって、そこにおいて当該イオン化可能官能基が、前記樹脂が前記標的タンパク質またはペプチドが当該樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、該タンパク質またはペプチドが当該樹脂から放出されるpHにおいては静電的に荷電しているように選択され、；および
- b) それ自身に取り付けられた非イオン化性リガンド、から成り、そこにおいて、水性培地が高または低いいずれのイオン強度を有している場合においても、該水性培地中の標的タンパク質またはペプチドの約40%、好ましくは50%以上が前記樹脂に吸着するものである。

ひとつの実施態様においては、樹脂-タンパク質/ペプチド複合体中の樹脂上に誘導された静電的電荷が、標的タンパク質またはペプチドの放出時のpHにおける正味の静電的荷電と同じ極性である。この実施例においては、放出は、樹脂と標的タンパク質またはペプチドとの間の荷電-荷電の反発により実現される。

別の実施態様においては、樹脂-タンパク質/ペプチド複合体中の樹脂上に誘

導された静電氣的電荷が、標的タンパク質またはペプチドの放出時のpHにおける正味の静電氣的荷電と反対の極性である。この実施例においては、放出は、高いイオン強度の溶出剤の使用により、またはアロヒレングリコール等の極性減少剤の使用により実現される。

本発明の方法の1つの態様においては、本発明は標的タンパク質またはペプチドを、標的タンパク質またはペプチドを含む水性溶液から分離する方法であって、樹脂が静電氣的に荷電していないpH、および水性培地が高または低いいずれのイオン強度である場合にも、水性培地中の標的タンパク質またはペプチドの約40%、好ましくは50%以上を樹脂に結合させるために十分な条件下で、培地を上記の樹脂と接触させることから成る方法である。

本発明の方法の別の態様においては、本発明は標的タンパク質またはペプチドを標的タンパク質またはペプチドを含む水性培地から結合および回収する方法であって、以下の工程：

a) 樹脂が静電氣的に荷電していないpHで、および水性培地が高または低いいずれのイオン強度である場合にも、水性培地中の標的タンパク質またはペプチドの約40%、好ましくは50%以上を樹脂に結合させるために十分な条件下で、培地を上記の樹脂と接触させ、

b) 結合した標的タンパク質またはペプチドを含む樹脂を他の培地成分から分離し、樹脂-タンパク質/ペプチド複合体を形成させ、；および

c) 結合した標的タンパク質またはペプチドを複合体から、樹脂上に電荷を誘導するpHを有する放出溶液と接触させる（そこにおいて、誘導された電荷が溶出pHにおける標的タンパク質またはペプチドの正味電荷と同じ極性である）ことにより放出する各工程から成る方法である。

本発明の方法のさらに別の態様においては、本発明は標的タンパク質またはペプチドを標的タンパク質またはペプチドを含む水性培地から結合および回収する方法であって、以下の工程：

a) 樹脂が静電氣的に荷電していないpHで、および水性培地が高または低いいずれのイオン強度である場合にも、水性培地中の標的タンパク質またはペプチドの約40%、好ましくは50%以上を樹脂に結合させるために十分な条件下で、

培地を上記の樹脂と接触させ、

b) 結合した標的タンパク質またはペプチドを含む樹脂を他の培地成分から分離し、樹脂-タンパク質/ペプチド複合体を形成させ、; および

c) 結合した標的タンパク質またはペプチドを複合体から、樹脂上に電荷を誘導するpHを有する放出溶液と接触させる(そこにおいて、誘導された電荷が溶出pHにおける標的タンパク質またはペプチドの正味電荷と同じ反対の極性である)ことにより放出する各工程から成る方法である。この実施態様においては、放出は、例えば高いイオン強度の放出溶液を用いること等によって実行されてもよい。

いずれの実施態様においても、プロピレングリコール等の極性減少剤を用いて放出を実行することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1はカルボニルジイミダゾール(CDI)により活性化されたマトリックスへのリガンドの取り付けを示す。

図2はリガンドのマトリックスのカルボキシル基へのカルボジイミドカップリングを示す。

図3はCDIカブロン酸支持体を示す。

図4はアミンとCDI-カブロン酸マトリックスとの濃縮(反応)により生じる生成物を示す。

図5はエボキシ活性化マトリックスとチオールとの反応を示す。

図6はエボキシ活性化マトリックスとアミンとの反応を示す。

図7は本発明において有用ないくつかの樹脂の構造を示す。

図8A-8Kはここに記載されている樹脂のいくつかの構造を示す。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、部分的には、水性培地から標的タンパク質またはペプチド(以降、しばしばまとめて「タンパク質」として言及される)を樹脂を用いて回収するための合理的な方法である。本発明の方法は、標的タンパク質またはペプチドのクロマトグラフ的回収に用いるための樹脂を、該樹脂が標的タンパク質またはペプチドが樹脂と結合するpHにおいては静電的に荷電しておらず、標的タンパク

質またはペプチドが樹脂から放出される pH においては静電的に荷電しているものであり、さらに水性培地が高または低いいずれのイオン強度を有している場合においても、該水性培地中の標的タンパク質またはペプチドの約40%、好ましくは50%以上が前記樹脂に吸着するものであるように選択することに関する。

ひとつの実施態様においては、イオン化可能リガンドが樹脂のマトリックスに共有結合で取り付けられており、そこにおいて、イオン化可能リガンドのイオン化可能官能基は、標的タンパク質またはペプチドの樹脂への結合 pH では静電的に荷電しておらず、標的タンパク質またはペプチドが樹脂から放出される pH では荷電しているように選択される。このことは、勿論、選択過程は、例えば、pI、安定性等の標的タンパク質の性質に関連し、イオン化可能官能基が非荷電／荷電である pH は標的タンパク質が十分に安定である pH 範囲に対応する等のようになされることを示唆する。当業者は容易に、この開示に基づいてこのようなパラメーターを確認することができる。

この実施の好ましい面においては、選択過程は、イオン化可能リガンドとともに用いられる固体支持マトリックス、およびそのようなリガンドのマトリックス上での密度の選択を含むように拡大され、そこにおいて、選択は、標的タンパク質の結合および樹脂からの放出 pH で全ての樹脂に要求される疎水性に関連してなされる。この観点から、固体支持マトリックスはイオン化可能官能基を有してなくても、標的タンパク質またはペプチドの結合 pH では静電的に荷電しておらず放出 pH では荷電しているイオン化可能官能基を有していてもどちらでもよい。付加的には、イオン化可能基は必要に応じて、スパーサーアームを有していてもよく、もし用いられた場合は、タンパク質結合および放出の pH での疎水性のさらなる調整を供与するよう選択される。

別の実施態様においては、固体支持マトリックスは、選択された1以上の、それ自体の骨格に取り込まれたイオン化可能官能基および、水性培地からの標的タンパク質の回収のために用いられるそれ自体に取り付けられた非イオン化性リガンドを有する。この実施においては、イオン化可能官能基は、標的タンパク質またはペプチドが、樹脂に結合する pH では静電的に荷電しておらず、標的タンパク質またはペプチドが樹脂から放出される pH では荷電しているように選択さ

れる。このことは、勿論、選択過程は、例えば、pI、安定性等の標的タンパク質の性質に関連し、イオン化可能官能基が非荷電／荷電であるpHは標的タンパク質が十分に安定であるpH範囲に対応する等のようになされることを示唆する。当業者は容易に、この開示に基づいてこのようなパラメーターを確認することができる。

この実施の好ましい面においては、選択過程は、結合および放出pHで全ての樹脂に要求される疎水性の程度に関連してなされる1以上の非イオン化性リガンドの選択を含むように拡大される。例えば、より疎水性の非イオン化性リガンドが、結合が増加されることが必要であれば、結合を増加させるために頻繁に用いられてもよく、一方で、放出を増加させるため、または必要であれば非特異的結合を減少させるために、より疎水性の少ない非イオン化性リガンドを頻繁に用いられなくてもよい。付加的には、非イオン化性リガンドは必要に応じて、非イオン化性リガンドをマトリックスに結合するためのスパーサーアームを有していてもよく、もし用いられた場合は、タンパク質結合および放出のpHでの疎水性のさらなる調整を供与するよう選択される。

何れの場合も、各々の樹脂の成分の適切な選択を成すことにより、標的タンパク質結合のpHでの、樹脂の疎水性の程度は、結合効率の促進および／または標的タンパク質またはペプチドの樹脂への結合特異性の増加のために合理的に選択される。同様に、標的タンパク質が樹脂から放出されるpHでの疎水性の程度は、誘導された電荷によって生じるものも含めて、適切な標的タンパク質の樹脂からの放出を確実にするために合理的に選択される。

本発明をより詳細に記述する前に、以下の用語を定義する。

#### 定義

「固体支持マトリックス」または「固体マトリックス」とは、リガンドをそれ自体に共有結合で取り付けることが可能な反応性官能基を有する樹脂の固体骨格材料を指す。骨格材料は、無機（シリカ等）または有機であってもよい。骨格材料が有機である場合には、固体ポリマーが好ましく、適切な有機ポリマーがこの分野で知られている。ここで記述される樹脂中で利用するために適切な固体支持マトリックスには、例えば、セルロース、再生セルロース、アガロース、シリカ

コートされたシリカ、デキストラン、ポリマー（例えばポリアクリル酸、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、市販のFractigel、EnzacrilおよびAzlactone等を含むポリメタクリルアミド、コポリマー（例えばスチレンおよびジビニルベンゼン等のコポリマー）、それらの混合物およびそれに類するもの等が含まれる。同様に、co-、ter-、および高度ポリマーを、少なくとも1以上のモノマーが含まれているかまたは、生成されるポリマー中に反応性官能基を含むよう派生されている場合には用いてもよい。

リガンドの共有結合での取り付けを可能とする固体支持マトリックスの反応性官能基は、この分野で良く知られている。そのような原子団には、ヒドロキシル（Si-OH等）、カルボニル、チオール、アミノおよびそれらに類するものが含まれる。従来の化学反応により、これらの官能基原子団を、リガンドをそれ自身に結合させるために用いることが可能である。付加的には、従来の化学反応により、そのような原子団を固体支持マトリックス中に含ませることが可能である。例えば、アクリル酸もしくはそのエステルを重合反応において用いることにより、カルボキシル基を直接取り込ませることが可能である。重合において、アクリル酸が用いられた場合はカルボキシル基が存在し、またはアクリル酸エステルが用いられた場合はポリマーがカルボキシル基を有するよう派生されうる。

「イオン化可能リガンド」という用語は、固体支持マトリックスに直接的またはスパーサーアームを通して共有結合で取り付けられた原子団であって、あるpHでは静電的に荷電しており別のpHでは静電的に荷電していない1以上の官能基を有する原子団を指す。好適なイオン化可能リガンドには、例えば、アミン基、フェノール基、イミダゾール基、およびその様なものが含まれる。置換基が、これらのリガンドが静電的に荷電または非荷電であるpHを変更するために、置換可能リガンド上に含まれていてもよい。例えば、1以上のニトロ基、ハロ基、アルキル基等をフェノール基上で含有することにより、この基が静電的に荷電するpHが変化するであろう。このようなリガンドの変更は従来技術の範囲内である。

「選択されたイオン化可能リガンド」とは、固体支持マトリックス上に共有結合により取り付けられるために選択されたりガンドまたはリガンドの混合物を指す。

イオン化可能リガンドの選択は、リガンドが誘導された静電氣的電荷を担持するpHに関連してなされる。順番に、結合および放出のために選択されたpHは、標的タンパク質のpIや安定性等の要素に依存する。従って、適切なイオン化可能リガンドの選択の根拠は、少なくとも部分的には、回収されるべき標的タンパク質と併存可能である条件下で静電氣的に荷電／非荷電であるイオン化可能リガンドの利用に基づいている。

「非イオン化性リガンド」という用語は、固体支持マトリックスに、直接的あるいはスパーサーアームを通して間接的に、共有結合により取り付けられた原子団であって、容易にイオン化可能である官能基を有しないものである。好適な非イオン化性リガンドには、例えば、アルキル基、芳香族基（例えばフェニル、ナフチル）およびアルキル芳香族基（例えばベンジル基）等が含まれる。

上記のように、イオン化可能および非イオン化性リガンドはいずれも直接的に共有結合により固体支持マトリックスに連結されるか、またはこれらのリガンドはイオン化可能官能基を固体支持マトリックス上に共有結合により連結するためのスパーサーを有している。従って、イオン化可能リガンドの固体支持マトリックスへの取り付けは以下のように説明される：

固体支持マトリックス-イオン化可能リガンド

リガンドがスパーサーアームを含む限り、上記の化学式はさらに以下のよう表現できる：

固体支持マトリックス-[スパーサーアーム] $n$ -R

ここにおいて $n$ は0または1；Rはイオン化可能官能基、および、スパーサーアームはイオン化可能官能基を固体支持マトリックスに共有結合により連結できる化学原子団である。スパーサーアームはイオン化可能官能基を欠いていても、また1以上のイオン化可能官能基、例えばヒスチジンまたはイミダゾール等であってもよい。

非イオン化性リガンドは、Rがイオン化可能官能基を有していないR1で置換



されていることおよびスベサアームがイオン化可能官能基を欠いていることを除いて、上記のイオン化可能リガンドと同様であってもよい。

図8Aから図8Kまではここに記載されている樹脂のいくつかの構成を示して

いる。特に、図8Aは、分野においてそれ自体が知られている化学反応による、リガンドの固体支持マトリックスへの直接的共有結合取り付けを示している。例えば、アクリル酸の重合は、マトリックスに直接的に共有結合により連結したイオン化可能なカルボキシル基を有する固体支持マトリックスとなる。同様に、アクリロニトリルの重合は、マトリックスに直接的に共有結合により連結した非イオン化性基を有する固体支持マトリックスとなる。

図8Bは、この分野でよく知られた以下に詳細に記述されているリガンドの一部を含み、リガンドに取り込まれている好適なスベサアームを介しての、リガンドの固体支持マトリックスへの取り付けを示している。好適な共有結合によるリガンドの固体支持マトリックスへの取り付けには、チオエーテル基、エーテル基、アミド基、ウレタン基、ジスルフィド基、尿素基、およびその様なものを通した共有結合での連結が含まれる。スベサアームには、例えば、 $\beta$ アラニン、 $\gamma$ アミノブチル酸 (GABA)、6アミノカプロン酸、1, 6-ジアミノヘキサン、メルカプト酸、ヒスチジン、チロシン、およびニトロチロシン等が含まれる。その他の好適なスベサアームはこの分野でよく立証されており、そのようなスベサアームの利用は重要ではない。

図8Cは、固体支持マトリックスの骨格に取り込まれたイオン化可能官能基もしくはイオン化可能官能基の混合物を有する樹脂を示している。

図8D-8Kはそれぞれ、ここに記載されている、この分野でそれ自体が知られている化学反応によってなされることが可能な樹脂の更なる構成を示している。特に示されていない限り、固体支持マトリックスは非イオン化性である。

「その骨格中に取り込まれている選択されたイオン化可能官能基を有する固体支持マトリックス」という表現は、ここでは、イオン化可能官能基をその骨格内に有している固体支持マトリックスを指す。このようなイオン化可能官能基は、イオン化可能リガンドは固体支持マトリックスの骨格にぶら下がっているが、他

方でイオン化可能官能基は骨格内に取り込まれているという点を除いて、イオン化可能リガンドと同じである。例えば、そのようなイオン化可能官能基は、二級または三級アミノ官能基を、例えば、この分野でよく知られたポリエチレンアミン等を含む骨格中に取り込むことにより生成され得る。

「標的タンパク質またはペプチドが樹脂に結合するpHにおいて静電的に荷電していない」という用語は、樹脂上のイオン化可能官能基の5%以下が標的タンパク質結合pHにおいて荷電していることを意味するものである。好ましくは、樹脂上のイオン化可能官能基の約1%以下がこのpHで荷電している。

当業者は、イオン化可能官能基によって発生される電荷の程度は官能基と接触している水性培地のpHおよび官能基のpKaに依存することを認識するであろう。樹脂のpKaにおいては、50%のイオン化可能官能基が静電的に荷電し50%のイオン化可能官能基が静電的に荷電していない。静電的に荷電していない樹脂上の官能基の要求される程度を達成するためにpHを調整することはここでの教示の意図の範囲内である。

「高イオン強度」という用語は、 $4.7 \text{ millimho (milliSemens (mS/cm}^2))$  の伝導率を提供するために要求されるのと同じかまたはそれ以上のイオン強度を意味する。例えば、そのような伝導率は  $250 \text{ millimolar (mM)}$  塩化ナトリウムを用いることにより達成される。「低イオン強度」とは、 $4.7 \text{ millimho}$  以下のイオン強度を意味する。溶液のイオン強度を決定する手順は当業者に良く知られている。

#### 方法論

タンパク質の精製において樹脂を用いることはこの分野で一般に知られている。これらの樹脂は通常は、リガンドが直接またはスパーサーを介して取り付けられている粒状またはビーズ状の固体支持マトリックスを含んでいる。標的タンパク質を含む溶液を樹脂に接触させる。樹脂と標的タンパク質との間の、例えば化学電荷、相対的疎水性、特異的吸着等の相互作用により、溶液中のタンパク質を樹脂に結合させることができる。樹脂とタンパク質との相互作用に反するように、特異的に放出バッファの条件を変更することにより、標的タンパク質を選択

的に放出させることができる。

ここに開示された方法は、例えば発酵液体培地等の水性培地からの天然または粗換えタンパク質を産業的な量で回収するための高い効率の手段を提供することに関する従来のタンパク質回収方法の改善を示すものである。1つの特に好ましい実施態様においては、ここに記述された方法は発酵液体培地からのタンパク質

の回収(例えばキモシンやスブチリシン)のために特に好適であるが、それは、精製はしばしば粗液体培地調製物から直接実行されることがあり、さらに、標的タンパク質以外の粗上清液体培地調製物の成分はこれらのマトリックスに結合しないであろうからである。

ここに記述された方法は非常に高いタンパク質の純度が要求されていない、例えば産業用酵素等の場合に特に有用であるが、それはこの純度のレベルを1段階の精製により達成できるからである。付加的には、液体培地をpH調整の後、もし必要であれば、希釈、濃縮、脱塩、加塩または微粒子の除去なしに充填してもよい。ここに記述されている樹脂は、イオン化不可能な樹脂と比較して、再生の利点を有しているものと考えられる。

ここに記載されている樹脂は、いくつかの重要な特性の組合せを提供する。それらにより、粗液体培地および混合物からのタンパク質の直接的な回収が可能となり、また、下流の工程の開始における顕著な精製が可能となる。脱塩効果は、引き続いてのクロマトグラフィー工程、即ちイオン交換または吸着クロマトグラフィーの前には好適である。これらは、過酷ではない条件下での迅速、安価な放出(例えば溶出等)を可能とする。最小のステップまたはグラジエント技術が要求されるが、追加の塩が少量要求されるか要求されず、溶媒が少量要求されるかまたは要求されない。

本発明の方法における結合の一般的な性質により、これらの方法は他の工程(例えばクロマトグラフィー的の工程)と比較して低い特異性を示すかもしれない。例えば、異なった宿主微生物は、異なった疎水性の異なった主要タンパク質混在物を有しているかもしれない[11]。それゆえ、かなりの量の非標的タンパク質の結合も起こりうるかも知れない。ここに記述されている方法を用いた特異性

には、ほとんどの混在物とは異なった標的タンパク質の疎水性および／または等電点(pI)が要求される。標的タンパク質ではない混在物と同程度の疎水性および等電点を有するタンパク質は、グラジエント溶出を行わない場合、混在物と共に溶出されることも有り得る。これには、ここに詳細に記述されているように、試料の前処理、またはリガンド、スパーサーおよびマトリックスの変形により対抗することができる。付加的には、ここに記述されている方法においては、タン

パク質の回収は高または低イオン強度でも可能であるので、樹脂に接触している溶液のイオン強度を変化させることにより、標的タンパク質を樹脂に結合させたまま、いくらかの不純物を除くことができるかも知れない。低イオン強度でのpHの変化もまた、他のタンパク質の中から1つのタンパク質を選択的に放出させることにおいて有用である。他方、「全体」タンパク質の結合は、例えばホエータンパク質回収等のいくつかの工程において優位である。ここに記述されている方法は、非共有結合的酵素固定化のためにもまた有用であり[12-16]、それは結合が強力でタンパク質回収が容易であるからである。

以下に記述されている方法は、標的タンパク質の結合のために有用な特定の樹脂を用いる。これらの樹脂への結合は、これらの樹脂が静電的に荷電していないpHでなされ、原理的に疎水性相互作用によって達成される。樹脂と標的タンパク質との間の結合pHでの疎水性相互作用の程度は、タンパク質の樹脂への結合強度が制御されるように合理的に選択される。そのような選択は、適当なマトリックスおよびリガンドの、スパーサーを含めた利用によりなされ、これらの材料の組合せにより樹脂の制御された疎水性が提供される。

さらに疎水性を制御する1つの手段は、高疎水性(例えばフェニルまたはベンジル基を含有等)またはより親水性(例えばアミドまたはウレタン基を含有等)の何れかである非イオン化性リガンドを固体支持マトリックス上に含ませることである。このような因子はここでの開示に基づいた従来の技術の範囲内である。好ましくは、非イオン化性リガンドの集団が用いられた場合、固体支持マトリックス上の非イオン化性リガンドの集団は、リガンドの総数(即ち、イオン化可能+非イオン化性リガンド)ベースで0から80%の範囲に入るであろう。

付加的には、1つのリガンドが固体支持マトリックスにチオエーテル結合を介して取り付けられた場合、樹脂の疎水性は、いくつかのまたは全ての、樹脂中の硫黄原子をスルホキシドおよび／またはスルホン基へと酸化することにより制御されてもよい。樹脂中に存在するスルホキシドおよび／またはスルホン基の数を増加させることにより、樹脂の疎水性は減少する。チオエーテルをスルホキシドまたはスルホン基に酸化するための適切な手順はこの分野でよく知られている。

固体支持マトリックスの骨格上にイオン化可能官能基が取り込まれている場合

樹脂上にイオン化可能リガンドを含ませることは必ずしも必要ではなく、このようなものが用いられなかった場合は、固体支持マトリックスに取り付けられた全てのリガンド非イオン化性であろう。この実施態様においては、固体支持マトリックスに取り付けられた非イオン化性リガンドの型と量を調整することにより、さらに樹脂の疎水性を制御することが可能である。

ここに記述されている方法は、組換え産物を含む幅広い範囲のタンパク質の回収に有用である。この方法はまた、植物および動物給源等の天然給源からの抽出物のタンパク質分離を行うためにも用いることができる。

ここに記述されている樹脂は、固体支持マトリックス上に取り付けられたイオン化可能および／または非イオン化性リガンドを用いる。リガンドの共有結合による取り付けのための如何なる方法も、取り付けにより、リガンド上の所望のイオン化可能基以外のイオン化可能基の導入という結果とならない限り用いることができる。そのようなリガンドの固体支持マトリックスへの取り付けの方法の例としては、共有結合によるチオエーテル、エーテル、アミドおよびウレタン結合がある。ほかのチオエーテルの方法、ジスルフィドによる取り付け、および尿素の方法もまた用いられてもよい。付加的には、ヒドラジンリガンドもまた、エポキシドまたはアルデヒド官能基と結合させてもよい。代表的なリガンド結合化学反応を表1に示す。他のリガンド取り付け化学反応も、ここ以外で説明されており、または、この分野で知られている。

表 1  
リガンド取り付け化学反応

| マトリックス官能基 | 活性化化学反応                | リガンド   |        |
|-----------|------------------------|--------|--------|
|           |                        | 反応性基   | 結合     |
| ヒドロキシル    | カルボニルジイミダゾール           | アミン    | ウレタン   |
|           | エポキシド                  | アミン    | アミン    |
|           |                        | チオール   | チオエーテル |
|           |                        | ヒドリン   | エーテル   |
|           | CNBr                   | アミン    | 多種     |
|           | 塩化トシル                  | アミン    | アミン    |
|           |                        | チオール   | チオエーテル |
|           | ジビニルスルホン               | アミン    | アミン    |
|           |                        | チオール   | チオエーテル |
|           |                        | ヒドリン   | エーテル   |
| カルボキシル    | カルボジイミド                | アミン    | アミド    |
| アミン       | カルボジイミド                | カルボキシル | アミド    |
| アミド       | ヒドラジン/HNO <sub>2</sub> | アミン    | アミド    |

各々の化学反応はこの分野でよく知られており、連結におけるカップリングの結果は上記の通りである。例えば、リガンドは、活性化されたセルロースマトリックス等の固体支持マトリックスに、カルボニルジイミダゾール (CDI) 試薬を図1および3に示されたように用いて中性ウレタン結合を通して取り付けられてもよい。他には、リガンドは、図4、実施例1および3に示されたように、アミノカプロン酸スパーサーアームで派生されたセルロースマトリックスへアミド結合を介して取り付けられてもよい。必要な場合は、スパーサーアームのカルボキシル基の100%の置換が成され得る。このような置換は、小イオン滴定等の分野でよく知られた技術で確認することができる。

カルボニルジイミダゾール (CDI) 活性化マトリックスを経由したリガンドの取り付けが図1に示されている。リガンドのマトリックスのカルボキシル基へのカルボジイミドカップリングは、図2に示されている。CDI-カプロン酸支持体は図3に示されている。起こりうるCDI-カプロン酸マトリックスの派生は図4に示されている。

リガンド取り付けのためのCDI活性化マトリックスとは別の選択としては、

図5および6にそれらの調製方法とそれらへのリガンド取り付けが例示されてい

るところのエポキシド基を含む樹脂が含まれる。特に、図5はチオール含有リガンドの、エポキシド活性化固体支持マトリックスへの取り付けを示している。この樹脂においては、リガンドは安定な、中性チオエーテル結合によって取り付けられている〔10〕。この化学反応により用いられ得るリガンドには、例えば、メルカプトベンズイミダゾール、4-メルカプトビリジン、2-メルカプトビリジン、メチマゾールおよび4-ヒドロキシチオフェノールを含みうる官能基が含まれる。図6はエポキシド活性化固体支持マトリックスとアミンとの反応を示している。両方の場合に用いられた化学反応は典型的には水性でありそれによってC D Iの方法よりは安価である。しかしながら、この化学反応はマトリックス中に、充填容量を減少させることもあり得る架橋を導入しうる。さらに、この化学反応を用いた場合の活性化レベルは典型的には低い。

マトリックスのチオールリガンドを用いた改変のための他の好ましい活性化剤は、1つの高度に反応性である基および1つのあまり反応性ではない基を有している。高度に反応性である基はマトリックスのヒドロキシル基とアルカリ性のpHにおいて反応し安定なエーテル結合を形成し、一方第2の基はこのような条件下では反応しない。このことは架橋を防ぐ。第1の活性化段階の後、第2の基を直接的に、ラジカル試薬または例えばチオール等の強力な求核物質と反応させる。第2の基はより反応性である型に改変されてもよく、続いて求核物質と反応させる。アリルハロゲン化物（例えばアリル臭化物）およびアリルグリシジルエーテルは好ましい試薬である。例えば、アリルグリコシルエーテルで活性化された固体支持マトリックスは、エピクロヒドリンで活性化されたものよりも高い置換レベルを可能とする。これらのリガンドの樹脂に対する共有結合による取り付けにおいては、アリル基はイオン化可能官能基を取り込むよう置換されていてもよい（例えば、臭化派生体を形成させるために臭素水と反応させ、続いて4-ヒドロキシ安息香酸ビスナトリウム塩と反応させる）。

しかしながら、イオン化可能リガンドを直接樹脂に取り付けてもよいことは理解される。このような状況では、樹脂はイオン化可能リガンドの直接の取り付けを含むよう調製されるか、またはそのような直接の取り付けを含むよう派生され

てもよい。例えば、メチルアクリル酸を含むモノマー組成物を重合させることにより、加溶媒分解によりポリマー中にアクリル酸単位を提供することが可能なメチルアクリル酸単位から成るポリマーを供与する。

イオン化可能官能基が固体支持マトリックス中に取り込まれていてもよいこともまた理解される。例えば、ボリアミンまたはアミン官能基を有するポリマーを、アミン官能基が低pHでイオン化可能であれば用いることができる。このような実施態様においては、ポリマーは他の官能基を含むように調製されてもよく、そしてリガンド取り付けはアミン基を通したものでもそのような他の官能基を通したものでもどちらでもよい。前者の実施においては、リガンド取り付け化学反応は、マトリックス骨格上にイオン化可能官能基の少なくとも一部を保持するように用いられる。イオン化可能官能基が骨格中に含まれている場合は、リガンドがイオン化可能官能基を含んでいる必要はなく、1つの実施例においては、マトリックスに取り付けられたリガンドは非イオン化性であり、別の態様では、リガンドの少なくとも一部がイオン化可能である。

ここに記載された樹脂上で有用なイオン化可能リガンドには、以下の実施例または上記の表1に記載された化学反応を用いて固体支持マトリックス上に共有結合により派生された3-(アミノメチル)ピリジン(3AMP)、4-(アミノメチル)ピリジン(4AMP)、1-(3-アミノプロピル)イミダゾール(API)、2-(アミノメチル)ベンズイミダゾール(AMB)、4-(3-アミノプロピル)モルホリン(APM)、ヒスタミンおよびそのようなものが含まれる。そのような取り付け化学物質は、上述のおよびここに添付した図面に記載されたCDI活性化およびCDI-カブロン酸活性化セルロースを含む。

疎水性アミンリガンドが用いられた場合は、それは好ましくは、2-フェニルエチルアミン、L-フェニルアラニンオール、(1R, 2S)-(-)-フェニルプロパノールアミン、トリブタミン、4-(2-アミノエチル)-ベンゼンシルホンアミド、(1S, 2S)-(+)-2-アミノフェニルプロパノールおよび1-ヘキシルアミンから成る群より選択される。

他の有用なリガンドには、置換されていないフェノールおよびpKaが6-9の範囲で置換されたフェノールを含むものが含まれる。これらは、負にイオ



ン化可能なリガンドの型として有用であろう。フェニル基の好適な置換基としては、ニトロ、ハロ（例えばクロロ、プロモ）、炭素原子が1-10のアルキル、炭素原子が1-10のアルコキシ、カルボニルエステルでエステル基が炭素原子1-10、シアノ、カルボニルアルキル（ $-C(O)R$ ）基で炭素原子が1-10、およびこれらの混合物が含まれる。典型的には、置換されたフェニル基は1から4のこのような置換基を有し、好ましくは1から2である。上記の置換基は、他の、ヒリジル基、ヒスチジル基、インドリル基、イミダゾリル基、モルホリニル基、ベンズイミダゾリル基およびその様なものを有するリガンドを含む、置換可能なリガンドに取り付けられていてもよい。

ここに示されたイオン化可能リガンドのリストは、包括的に意図されたものではなく、これらのリガンドの固体支持マトリックスへの共有結合による取り付けに用いられた化学物質でもない。好ましいリガンドは、これらのリガンドのマトリックスへの共有結合での取り付けに用いられる化学反応と同様にこの分野でよく知られていることに注意すれば十分である。さらに、いずれの固体支持マトリックス上のイオン化可能官能基と同様に、イオン化可能リガンドに共通して、あるpHでは静電的に荷電しておりかつpHでは静電的に荷電していない1以上の官能基が存在することに注意すれば十分である。樹脂上に用いられた特定の官能基が重要なのではない。

イオン化可能リガンドおよび/またはイオン化可能官能基は、好ましくは、樹脂上に高および低イオン強度のどちらでも標的タンパク質の結合を可能とするために十分な濃度で存在する。好ましくは、イオン化可能官能基は、樹脂上で乾燥樹脂gあたり0.4mmolから約3mmol（または0.05-0.5mmol/ml）の濃度で存在する。とりわけ好ましい1つの実施態様においては、非イオン化性リガンドがイオン化可能官能基と組み合わされて、樹脂との標的タンパク質の結合および樹脂からの放出のpHにおいて、さらに疎水性/親水性の程度に関して制御することを提供するように用いられている。この実施態様においては、非イオン化性リガンドの全リガンド数に対するパーセンテージは約0から約80パーセントの範囲にあり、好ましくは0から40パーセントである。

本発明の方法においては、回収されるべき標的タンパク質を含む水溶液または

水性培地を、樹脂と、樹脂が静電的に荷電していないpHで接触させる。このpHにおいては、結合は主に疎水性相互作用によるものであり、樹脂の疎水性はリガンドを樹脂に取り付けるために用いられた何れのスぺーサーアームの改変により、より疎水性または疎水性の低い固体支持マトリックスを用いることにより、非イオン化性リガンドを用いることにより、より疎水性または疎水性のイオン化可能リガンドを用いることにより、樹脂上のリガンドの密度を調整することにより、またはこれらを組み合わせて調整することができる。ここでの教示の観点から、当業者は、所望の促進と関連した標的タンパク質の性質に基づいて、合理的に変数を調整することができる。

キモシン等の回収されるべき標的タンパク質を含む培地は、微生物および動物起源を含む何れの公知のタンパク質給源から派生されてもよい。例えば、キモシン溶液は、*Aspergillus*、*E. coli*、酵母からの培養液体培地を、牛の胃から得られた水性抽出物と同様に含んでもよい。

水性培地は樹脂への結合効率を増加するために、バッファーおよび/または塩を含んでもよい。好適な塩はタンパク質クロマトグラフィーにおいて従来から用いられているもので、例えば、塩酸、硫酸、リン酸および酢酸のリチウム、ナトリウム、カリウムおよびアンモニウム塩を含んでもよい。好ましくは、効果的で、高価でなく、安全であるため塩化ナトリウムを用いる。上記のように、ここに記述されている樹脂は、高および低塩濃度の両方で水性培地由来タンパク質を結合する。特に、これらの樹脂は約50%またはそれ以上の、高および低塩濃度の水性培地中の標的タンパク質を結合する。勿論、用いられた樹脂が培地中の全てのタンパク質を結合するために十分な容量を有していることは理解される。

水性培地は標的タンパク質が樹脂と結合するために十分な時間にわたり樹脂と接触させる。この接触は、例えば、樹脂がカラムに充填されていたり、液体化ベッド中で用いられていた、または樹脂が水性タンパク質培地と混合されている攪拌パッチシステムに懸濁されて成されてもよい。このような条件下で、標的タンパク質は樹脂に結合し、それによって樹脂-タンパク質複合体を形成する。水性培地を樹脂と接触させた後、樹脂を洗って水性培地と同じpHのバッファーで洗浄し、水性培地を樹脂およびそれに結合したタンパク質と分離する。このパッ

ファーは必要に応じて2 Mまでの上にリストされた塩を含有していてもよい。

標的タンパク質を、続いて、単に樹脂を、樹脂上に静電的電荷を誘導するpHを有する水性培地と接触させることにより放出させる。樹脂上に誘導された電荷は、標的タンパク質の電荷と同じでも異なっている、即ち反対の極性でもよい。本発明の好ましい実施態様においては、誘導される樹脂上の電荷は標的タンパク質の放出pHにおける正味電荷と同じ極性であり、樹脂と標的タンパク質との間に、樹脂との何れの疎水性相互作用を克服するためにも十分な電荷-電荷反発がその結果生じ、それにより樹脂からの放出が成される。このことは、上記の樹脂の相対的な疎水性を合理的に選択することおよび/または効果的に大きい静電的電荷を放出pHで樹脂上に提供するために充分なイオン化可能リガンドを取り込ませることにより実現できる。

本発明の別の好ましい実施例においては、樹脂上に誘導された電荷は、放出pHにおける標的タンパク質上の正味電荷と反対の極性である。この実施例においては、標的タンパク質の樹脂からの放出は、例えば、高イオン強度の放出溶液の使用等によって実行される。何れの実施態様においても、プロピレングリコール等の極性減少剤を使用することにより、標的タンパク質またはペプチドを樹脂からの放出を実行することができる。

リガンド選択はタンパク質のpH制限に基づいている。例えば、ある事情の下では、タンパク質が安定なpHで正の誘導される電荷を有する樹脂を用いることが、タンパク質の結合および放出のための極端なpHを回避するために望ましいことも有り得る。同様にタンパク質が安定であるpHで負の誘導される電荷を有するリガンドが好ましいことも有り得る。このようなリガンドには、例えば、カブロン酸(pHが約3.3から滴定)等が含まれる。例えばチラミン等のフェノールリガンドもまた、この点に関し、フェノールはpH6以上で滴定するので好ましい。ニトロ化またはクロロ化フェノールまたはチラミンリガンドは、中性pHにちかいpKa値を有しているため特に有用である。

タンパク質が生理的pHにおいてのみ安定である別の実施例においては、固体支持マトリックスに取り付けられたイオン化可能リガンドは、pH5から9、より好ましくは5.5から8.5のpH範囲において滴定(静電的に荷電するこ

と)が始まる樹脂を提供しなければならない。その様な範囲は、多くのタンパク質の場合、より極端なpH範囲と比較した場合、変性等の危険を減少するpH範囲での標的タンパク質の結合および放出を可能とする。

ここに記述されている方法においては、マトリックス上のリガンド密度は、標的タンパク質の結合が高および低イオン強度で達成されるよう選択されている。これにより、希釈、濃縮、脱塩、加塩または微粒子除去をすることなく、水性タンパク質培地を処理できる。ここに記述されている樹脂を用いることによって期待される別の利点は、これらの樹脂が、培地からタンパク質を分離するために以前に用いられていたマトリックスよりも少ない汚れて済むであろうことである。

上記の方法での樹脂からの標的タンパク質の分離において、回収された標的タンパク質溶液はさらに従来の方法で処理されてもよい。

この工程で用いられた樹脂は、従来の方法で再生できる。例えば、誘導可能な正の電荷を有する樹脂は、エタノールやエチレングリコール等の極性減少剤とともに、またはそれらなしに0.1M HClを使用することにより再生され得る。同様に、誘導可能な負の電荷を有する樹脂は、再びエタノールやエチレングリコール等の極性減少剤とともに、またはそれらなしに0.1M NaOHを使用することにより再生され得る。しかしながら、この後者の工程はC/Dマトリックスの加水分解という結果となり得、またマトリックスの膨張を引き起こす事もあり得る。セルロースマトリックスを活性化の前に架橋することにより、膨張を減少させカラムの流率を改善することができる。架橋は正にイオン化可能なマトリックスにおいてもまた用いられてもよい。

汚れが問題となった場合、DEAE等の安価な樹脂を高イオン強度で通すフローによる等のその他の粗培地または液体培地の前処理により、分離が改善されるかも知れない。例えば、スプチャリン試料のDEAEカラムで前処理すると、99%以上の酵素活性を保持しながら、顕著に混在物を減少させる。混在物の減少は、再生、樹脂の寿命および容量を改善する。この余分な工程は、前処理カラムを通したフローが、バッファー調整を行うことなく直接に本発明の分離システムに充填されることが可能な場合に特に適している。

ここに記述されている方法の1つの例においては、カルボキシル基が実質的に

静電的に荷電していないpH2で、CDI-カプロン酸セルロース（またはセファロース）にキモシンが結合した。溶出はカルボキシル基が実質的に荷電しているpH6で行い、放出は樹脂とキモシンとの間の電荷-電荷反発に關与していた。

第2の例では、ビリジン/イミダゾール官能基を有する樹脂がいくつかのタンパク質の精製のために有用である。例えば、セルロース-CDI-カプロン酸は3-ジエチルアミノプロピルアミン（DEAPA）（ $pK_a$  = 約9.5）および1-（3-アミノプロピル）イミダゾール（API）（ $pK_a$  = 約6.2）によって100%置換された。これらの樹脂は、1M NaClで、これらの樹脂がこのpHで大幅に荷電しているpHであるpH 5.5で、キモシン等のタンパク質を結合しない。如何なる理論にも限定するものではないが、これらの樹脂上の正の電荷は疎水性結合を破壊しているようである。これとは逆に、キモシンは0.5M NaClで、CDI活性化Perlozaを2-（アミノメチル）ビリジン（ $pK_a$  = 約4.1）で反応させて調製した樹脂と、樹脂が静電的に大幅に荷電していないpH値であるpH6で成功して結合する。ビリジル樹脂は、樹脂ビリジン基を荷電型に滴定するpH2のバッファーで溶出した。キモシンの好ましい作用pH範囲は2および4.5-6.5であり、ビリジル樹脂はこの範囲において十分機能したことに注意されたい。

上記の結果は対応する樹脂を標的タンパク質と組み合わせて回収を行うために用いることを示している。従って、バッファー系、およびそれゆえタンパク質回収に用いられるイオン化可能官能基は精製されるべきタンパク質に応じて変化する。例えば、キモシンとは異なり、スブチリシンはpH4.5以下では不安定なので、このpH以下のバッファーは使用できない。これに加えて、スブチリシンと作用させる場合は、 $Ca^{2+}$ が酵素を安定化させるので、 $Ca^{2+}$ キレート化を避けるために、クエン酸バッファーは避けられなければならない。スブチリシンの好適な作用範囲はpH5-7である。pH7-10の範囲での操作は限られた期間のみ許容されるであろう。

スブチリシン回収方法については、100-200mMのモル濃度を有するバッファーが、放出に要求される最初のpH調整のために有用である。いったんp

Hを調整したら、バッファのモル濃度は希釈により減少させることができる。酢酸バッファ（pH 5.2）は、最も疎水的で正に荷電したイオン化可能マトリックスに効率的な回収を供与する。8%蟻酸、40%プロピレングリコールを含むpH 5.5のグリコールバッファは、試験された全てのマトリックスからスブチリシンを放出した。疎水性で負にイオン化可能であるマトリックスについては、pHを増加することにより放出効率は増加したが、スブチリシンの安定性は減少した。pH 7-9のグリコールバッファが好ましい。これにより迅速なpH調整、および極端なpHを用いない良好な放出プロフィールがもたらされる。

別の実施例では、疎水性アミンリガンドを用いた。これらのリガンドはエボキシセファロースに取り付けられ、大部分はpH 10では静電的に荷電されていない。10以下のpHの値では、これらのマトリックスは第2級アミン結合において荷電するようになる。低イオン強度でpH 10.5で充填し、スブチリシン（その全体の開示がここに参考文献として取り込まれている1993年2月9日に査定された米国特許第5185258号に記載されたように得られた）は以下のリガンドを用いて結合させた：APP、AEBBS、およびトリプタミン。トリプタミンセファロースのみはpH 10.5+0.5M NaClで結合した。pH 9で強力に結合したマトリックスはないが、スブチリシンのこれらのマトリックスの通過は遅れた。上記のことは、このような樹脂を用いたスブチリシン精製には極端なpHと強力に疎水性であるリガンドが必要であることを示している。

スブチリシンの充填に高いpHが要求されることは安定性の問題のため満足すべきことではない。それ故に、pH 7-9で静電的に荷電しておらずこれらのpHでスブチリシンを結合させるが、pH 5-6では部分的または全体的にイオン化し、スブチリシンを放出する樹脂を開発した。このような樹脂の1つの例は、pH 8（高イオン強度）以上では静電的に荷電しておらずpH 8.5でスブチリシンを結合する100%API置換CDI-カブロン酸セルロースである。

別の例には、スブチリシンをpH 8.0で結合するAPP（67%）およびAPI（33%）混合樹脂がある。

さらに他の例には、pH 6.5以上では静電的に荷電しておらずpH 7でス

ブチリシンを結合する100%3-および4-ヒリジル置換リガンドを有する樹脂である。

標的タンパク質はこれらの各々の樹脂から、樹脂を含むバッファーのpHを減少させて溶出されてもよい。例えば、これらの物質の何れかから、pHを5.2に減少させることにより放出され、いくつかのイオン化可能リガンド基はプロトン化型に滴定されている。故に、スブチリシンの結合は、水素結合と電荷移動の貢献の可能性もあるが、疎水性相互作用によるものであり、放出は電荷の反発および/または疎水性相互作用の崩壊によるものであった。これらの樹脂は低または高イオン強度で充填されてもよく、その様にして試料の前処理における透析または希釈の要求を取り除く。

キモシンの場合は、このタンパク質の樹脂からの放出には、pH4以下、好ましくはpH2に調整されたpHを有するバッファー溶液を用いる。好適な溶出バッファー溶液は付加的に約20mMから約50mMの塩化カリウムを含有する。

ここに記述されている方法の更なる実施態様は、上記の樹脂を用いた酵素を含むタンパク質の精製方法に関する。標的タンパク質は、そこからそれ自身が精製される他のタンパク質を含む水性培地中にあってもよいことは理解される。この培地は、タンパク質に加えて、アミノ酸、多糖、糖、有機酸および塩を含む多様な生物物質を含む粗発酵液体培地であってもよい。これらの方法は、キモシンとスブチリシンを例としてここに詳細に記述されているが、開示された樹脂と方法を用いて他の標的タンパク質を精製することも可能であることを熟慮されたい。

特定の実施例においては、本発明は、キモシンを含む水性培地からキモシンを分離する方法であり、その方法はタンパク質の水性培地を、以前に記載された樹脂の何れかと、キモシンと樹脂とを結合させるために十分な時間接触させ、樹脂/キモシン複合体を水性培地から分離し、続いてキモシンを樹脂から回収することから成る。精製されるべきキモシンは *Aspergillus*、*E. coli*、酵母、牛の胃を含む何れの公知の酵素源から得られてもよい。同様のスブチリシンの分離および精製のための工程が本発明の範囲に含まれている。

樹脂が、固体支持マトリックスに取り付けられた正に誘導可能リガンドを含

有し標的タンパク質がキモシンを含む工程の実施態様においては、本発明の工程

は好ましくは、樹脂が静電的に荷電していないように水性培地のpHを調整することを含む。この方法はさらに、樹脂と接触させる前に、タンパク質水性培地へ、2 Mまでの塩を添加することを含んでもよい。上にリストされたものが有用な塩に含まれる。

タンパク質の水性培地は続いて樹脂と、キモシンと樹脂とを結合させるために十分な時間接触させられる。この接触は、例えば、樹脂がカラムに充填されていたり、液体化ベッド中で用いられていたり、または樹脂が水性タンパク質培地と混合されている攪拌パッチシステムに懸濁されて成されても良く、その後水性培地から逡巡される。水性培地を樹脂と接触させた後、樹脂を続いて水性培地と同じpHのバッファーで洗浄し、水性培地を樹脂およびそれに結合したタンパク質と分離する。このバッファーは必要に応じて2 Mまでの上にリストされた塩を含んじていてもよい。

キモシンは樹脂上に正の電荷を誘導可能であるよう十分に低くpHを調整されたバッファー溶液を用いて樹脂から回収することができる。好ましい放出バッファー溶液は約20 mMから約50 mMの塩化ナトリウムまたはカリウムを含んでいる。

ここに記述されている樹脂は、単純な結合および放出工程を用いた大量タンパク質回収のための特定の用途を有しているが、ここに記述されている樹脂および方法はFPLCおよびHPLC分析または高価値調製の用途に用いられてもよい。特に、塩減少グラジエントが、静電的に荷電していないマトリックス、および(a)静電的に荷電した型へのpHシフトとそれに続く塩増加グラジエントまたは(b)中性の型のpHからさらにシフトしたpHグラジエント溶出とともに用いられてもよい。

吸着リガンドとイオン化可能リガンドとの混合物を用いることにより、アフィニティー結合の利点が、静電的な反発による容易な放出と組み合わせられる。結合は滴定可能なりガンドが静電的に荷電していないか不活性であるpHであり、放出はpH変化によって成される。



さらに、本発明の樹脂およびシステムは、例えば液体-液体抽出およびポリマー/UFシステム等のクロマトグラフィー樹脂システムに応用されてもよい。

例えばポリエチレングリコール等の、液体-液体抽出[19, 20]のための改変相-分離ポリマー、改変膜[21]または可溶性ポリマーUF法[22, 23]もまた、本発明のシステムを用いることができる。このような実施態様においては、樹脂およびマトリックスは固体または水不溶性である必要はない。

#### 実施例

以下の実施例は本発明の特定の実施態様をあらわすために示され、本発明の範囲に限定として解釈されてはならない。

実施例IからVIまでは活性化樹脂の調製および/またはそれに続く代表的なリガンドの取り付けを示すものである。実施例VIIは代表的な樹脂の、酵素スプテリシンに対する結合容量を示している。実施例VIIIおよびIXは、本発明に有用な代表的な樹脂の、典型的な滴定のデータを示している。そして実施例XおよびXIにおいては、スプテリシンの回収が示されている。

これらの実施例においては、用いられた略語は以下の意味を有している。定義されていない場合は、用いられた如何なる略語も一般に許容された意味を有している。

A E B S = p - (2 アミノエチル) ベンゼンスルホンアミド;

A P I = A P イミダゾール = 1 - (3 - アミノプロピル) イミダゾール;

A M B = A M ベンズイミダゾール = 2 - (アミノメチル) ベンズイミダゾール;

A P M = A M モルホリン = 1 - (3 - アミノプロピル) モルホリン;

2 A M P = 2 A M ビリジン = 2 - (アミノメチル) ビリジン;

3 A M P = 3 A M ビリジン = 3 - (アミノメチル) ビリジン;

4 A M P = 4 A M ビリジン = 4 - (アミノメチル) ビリジン;

A P P = (1 S, 2 S) - (+) - 2 - アミノフェニルプロパンジオール;

|           |  |
|-----------|--|
| C D I     | =カルボニルジイミダゾール  |
| C M       | =カルボキシメチル；   |
| C M C     | =1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボ<br>ジイミド；                      |
| C V       | =カラム容量；  |
| D A H     | =ジアミノヘキサミン；  |
| D E A P A | =3-ジエチルアミノプロピルアミン；   |
| D M F     | =ジメチルホルムアミド；   |
| D M S O   | =ジメチルスルホキシド；   |
| E C H     | =エピクロロヒドリン；  |
| E D C     | = (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボ<br>ジイミド；                     |
| E E D Q   | =N-エトキシカルボニル-2-エトキシジヒドロキノリン；                               |
| g         | =グラム；  |
| H E X     | =ヘキシルアミン=1-ヘキシルアミン；  |
| L I S     | =低イオン強度；   |
| M         | =モル濃度；   |
| m g       | =ミリグラム   |
| M G 1     | =1-(3-アミノプロピル)イミダゾール置換Perloza<br>a樹脂；                      |
| M G 2     | =4-(アミノメチル)ピリジン置換Perloza樹脂；                                |
| m M       | =ミリモル濃度；   |
| m m h o   | =ミリmho (ミリSeimens/cm <sup>2</sup> またはmS/cm <sup>2</sup> )； |
| m m o l   | =ミリモル；   |
| M B       | =メルカプトベンズイミダゾール；   |
| メチマゾール    | =2-メルカプト-1-メチルイミダゾール；                                      |
| M P       | =4 M P = 4-メルカプトピリジン                                       |

|      |                            |
|------|----------------------------|
| P    | = Perloza ;                |
| PCC  | = Perloza-CDI アミノカプロン酸樹脂 ; |
| PCDI | = CDI 活性化 Perloza ;        |
| PPA  | = フェニルプロパノールアミン ;          |

|      |            |
|------|------------|
| S    | = セファロース ; |
| TRPN | = トリアタミン ; |

上記の略語を用いて、以下の実施例において用いられた樹脂は、一般に以下のように省略されている：[マトリックス] - [カップリング方法] - [存在する場合はスパーサーアーム] / [イオン化可能官能基]。例えば、「PCDI 4AMビリジン」は、カルボニルジイミダゾール (CDI) によって活性化され、4-アミノメチルビリジン基とカップリングされた Perloza 固体支持マトリックス (P) を指し；「SECH MB」はエピクロヒドリン (ECH) で活性化され、メルカプトベンズイミダゾール (MB) 基とカップリングされたセファロース固体支持マトリックス (S) を指し；そして「PCDI DAH ヒドロキシフェニル酢酸」とは、カルボニルジイミダゾール (CDI) で活性化され、ジアミノヘキサン (DAH) スパーサーを通してヒドロキシフェニル酢酸とカップリングされた Perloza 固体支持マトリックス (P) を指す。もちろんのことであるが、スパーサーアーム (存在する場合) およびイオン化可能官能基 (群) はイオン化可能リガンドを含むことは理解される。

#### 実施例 I

##### エポキシド活性化

前もって10倍量の水で洗浄したセファロース6B (50g) を、47 ml の1M NaOH および5 ml のエピクロヒドリンと4℃で24時間におたり混合した。エポキシド基置換がこの分野で公知の方法で、1.06 mmol/g と決定された。同様の活性化により、1.28 mmol および1.02 mmol/g のエポキシド基置換が供与された。

#### 実施例 II

##### エポキシド化セファロースへのアミンリガンドの取り付け

エポキシド化されたセファロース(10g、1.06mmol/g乾燥)を実施例Iに記載されたように調製し、5モル濃度過剰(即ち、5モルのリガンド/樹脂の反応性基のモル数)の、AEBs、APPまたはTRPNから選択され4mlのDMSOと2mlの水に溶解されたリガンドとを、37℃で24時間混合した。同様に5モル濃度過剰のHEXを10gのエポキシド化セファロース(1

28mmol/g乾燥)と混合した。その結果生じた樹脂を10倍量の50%DMSO(DMSO:水=1:1)(トリブタミン樹脂のみ)、10倍量の水、2倍量の0.1M塩酸およびさらに10倍量の水で洗浄した。リガンドの置換は、0.1M塩酸でのpH4までの滴定により、APPセファロースは0.81mmol/g、そしてHEXセファロースは0.99mmol/gと決定された。このことは、約80%のリガンドのエポキシド基の置換効率を示している。

#### 実施例II

##### アリルグリシジルエーテル活性化

Perlozaセルロース(Secheza, Czechoslovakiaより入手可能な、Perloza MT100ファインビーズ化セルロース)を、5倍量の水(ミリQグレードの水)および3倍量の0.3M NaOHで洗浄し、吸引乾燥した。40g量のマトリックスを12mlの99+%アリルグリシジルエーテルと激しく振とうさせながら混合した。混合物を時々振とうしながら室温に48時間にわたって放置した。活性化マトリックスを10倍量の水で洗浄し3倍量の水で懸濁した。臭素水(1%)をゆっくりと5分間にわたって、混合物が臭素水をそれ以上脱色しなくなるまで加えた。臭素化樹脂を10倍量の水で洗浄した。樹脂上のアリル基の濃度は脱色された臭素水の量に基づいて決定された。樹脂上の反応性臭素基の濃度(1g試料を9mlの水に懸濁)を、0.5gの亜硫酸ナトリウムでの置換(60℃、4時間)とその後のpH8までの0.1M NaOH滴定により決定した。

#### 実施例IV

##### チオールリガンドの取り付け

実施例 I または上記の I I I に記載されているように調製された樹脂 (5 g) を、5 ml の 1 M リン酸バッファー (pH 7) に懸濁し、窒素にあてた。MB、4 MP またはメチマゾールから選択し、5 ml の DMSO に溶解した 5 モル濃度過剰のリガンドおよび 0.1 g のボロヒドリドナトリウムを加え、混合物を 6 時間反応させた。実施例 I の方法で生成された樹脂は室温で維持された。実施例 I I I の方法で生成された樹脂は 60°C で維持された。その結果生成したチオエーテル樹脂を、5 倍量の 0.1 M 塩酸、10 倍量の水、5 倍量の 0.1 M NaOH

OH および 20 倍量の水で洗浄した。試料 (1 g) を 0.1 M 塩酸で pH 3.5-2.7 (MB リガンドの最低 pH) まで滴定した。

#### 実施例 V

##### CDI 活性化およびリガンド/スパーサーアームの取り付け

セファロース CL 6B および Perloza セルロースを CDI により活性化し、公知の技術により滴定した。20 から 80 mg の CDI を g あたりのセファロース、30 から 120 mg の CDI を g あたりのセルロースに用いることにより、1.0 および 3.5 mmol/g の活性化レベルを得た。

ジオキサン可溶アミン試薬 API、APM、ヒスタミン、AMB、4 AMP、2 AMP、DAH、チラミン (塩化水素から、水に溶かし、pH 12 に 1 M NaOH により調節し、凍結乾燥して調製)、およびジブロモチラミン (チラミン塩酸から分野で公知の方法により調製) を直接、10 g のジオキサン溶解 CDI 活性化マトリックスと反応させた (1 ml の水がチラミンリガンドに含まれていた)。10 モル濃度過剰を用いた DAH 以外は 5 モル濃度過剰のアミン試薬を用いた。ジオキサン (5 ml) を加え、樹脂を 24 時間室温で混合した。樹脂を 3 倍量の 75% ジオキサンで洗浄し、2 倍量の 33% ジオキサン、10 倍量の水、2 倍量の 0.1 M HCl およびさらに 10 倍量の水で洗浄した。

アミノカプロン酸およびニトロチロシン (ナトリウム塩の型) はジオキサンには溶解しない。それゆえ、アミノカプロン酸ナトリウムの 40% 溶液を、80 g のアミノカプロン酸を 64 ml の 10 M NaOH および最終容量 200 ml ま

での水に溶解させることにより調製した。ジオキサン溶解活性化セルロース（300g樹脂+150mlジオキサン）およびセファロース（100g樹脂+50mlジオキサン）を、それぞれ80mlおよび30mlのアミノカブロン酸ナトリウム溶液と室温で24時間混合させた。アミノカブロン酸樹脂は2倍量の66%ジオキサン、2倍量の33%ジオキサンおよび20倍量の水で洗浄した。同様に、ニトロチロシンを3M NaOHと水に溶解してpH11.3の15%溶液を生成した。活性化セルロース（10g）、50%ジオキサンに溶解、を13mlのニトロチロシン溶液と、室温で24時間にわたって混合した。

#### 実施例VI

##### アミド結合によるリガンドの取り付け

##### A. アミノリガンドの樹脂カルボキシル基への取り付け

4AMP、3AMP、DEAPAまたはAPIから選択されたリガンドを5モル濃度過剰を、6M HClによりpH4.7に調整し、実施例Vで記載されているように調製したアミノカブロン酸樹脂（1.55mmol/g）と混合した。適宜1M HClまたはNaOHによってpHを4.7に調整し、3モル濃度過剰の水溶性カルボジイミド（EDC、50%水溶液）を添加した。pHを4.7に適宜1M HClまたはNaOHによって1時間にわたり維持し、さらに調整すること無しに室温で10時間混合した。さらに1モル濃度過剰のEDCを加え、pHを1時間にわたり調整し、前のように攪拌を10時間継続した。続いて樹脂を10倍量の水、2倍量の0.1M HClおよび10倍量の水で洗浄した。エタノールアミンをニトロチロシンセルロースと同様の方法でカップリングさせた。これらの樹脂上で、20マイクロモル/gに感受性を有する滴定では、残存カルボキシル基は検出されなかった。

##### B. ジアミノヘキササン樹脂へのカルボキシルリガンドのカップリング

用いられた方法は、上記実施例VI（a）と同様であるが、リガンド溶液（4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル酢酸または3-ニトロ-4-ヒドロキシ安息香酸から選択されたリガンドを含む）のpHを1M NaOHを用いて調整し、pHは5に維持され、ジアミノヘキササンセルロース

を用い、0.1 M NaOHによる洗浄はHCl洗浄に置き換えられた。

ジクロロサリチル酸のため、ナトリウム塩を、1 M NaOHを酸(0.3 g)の水懸濁液にpHが7で安定するまで加え、続いて溶液を凍結乾燥させて調製した。その結果生成した塩を10 mlのDMSOに溶解させ、EEDQ(0.5 gを5 mlのエタノールに溶解)および50% DMSOに溶解させたジアミノヘキサセルロースと混合した。混合物は室温で6時間振とうした。さらに0.5 gのEEDQを加え、反応を18時間継続した。樹脂を5倍量のDMSO、2倍量の50% DMSO、10倍量の0.1 M NaOHおよび10倍量の水で洗浄した。樹脂アミン基のこれらの方法によるカップリングは、わずかに完全の80から90%であった。残存アミノ基はこの分野で公知の方法により(例えばアセチル

化により)ブロックした。

#### 実施例VI1

##### 粗スブチリシンに対する樹脂容量

その全体の開示がここに参考文献として取り込まれている1993年2月9日に査定された米国特許第5185258号に記載されたように得られたスブチリシン派生体を用いた、パッチ操作による容量試験を行った。用いられた充填バッファは、

pH8: 25 mM TRIS (登録商標) + 0.5 M NaCl

pH7: 10 mM リン酸 + 0.5 M NaCl

樹脂を充填バッファ(5倍量)で平衡化し、吸引乾燥した。樹脂の1つの試料(2 gから4 g)の質量を測定し、10 ml 検量シリンダーに入れ、充填バッファ中に懸濁し、静置させるために48時間放置した(樹脂の質量:容積比を決定するため)。別の樹脂試料(0.1から0.15 g)を質量測定し、25 mlのバイアルに入れ、あらかじめ1 M NaOHにより充填pHに調節された8 mlのスブチリシンと、1時間、4℃で回転ホイール上で混合した。バイアルの中身を定量的に、Pierce ディスボーザブル2 ml ミニカラムに移し、10 mlの充填バッファで洗浄した。樹脂を25 mM 酢酸バッファ(pH5、2

）で、10mlの容積測定フラスコ中に溶出させた。この溶出は、酵素活性（サキシニルalala-alapro-phe-pNA基質アッセイ方法を用いた）およびタンパク質含量（280nmでの吸収およびビシコン酸（bicinchonic acid）アッセイを用いた）をアッセイした。樹脂のmgタンパク質/ml樹脂で表した容量のデータを表2に示す。活性は、mg/mlでの活性タンパク質濃度を供与するために計算されたスプチリシン濃度に言及している。

表2  
スプチリシン容量のデータ

| 樹脂                                       | 活性   | バッチ容量mg/ml     |         |
|--|------|----------------|---------|
|  |      | 吸収<br>(280nm)* | タンパク質** |
| PCC 3AMt <sup>®</sup> リジソ<br>充填 pH 7.0   | 13   | 51             | 50      |
| PCC 4AMt <sup>®</sup> リジソ<br>充填 pH 7.0   | 15.2 | 59             | 35      |
| PCC 4AMt <sup>®</sup> リジソ<br>充填 pH 8.0   | 20   | 60             | 75      |
| P CDI 4AMt <sup>®</sup> リジソ<br>充填 pH 8.0 | 18.2 | 51             | 67      |
| PCC APP 67/API33<br>充填 pH 8.0            | 13.5 | 41             | 44      |

\* A<sub>280nm</sub>の1.0 が1mg/mlに相当すると仮定

\*\* ビシコン酸タンパク質アッセイ、BSAスタンダード

表2中のデータは上記の樹脂が良好なスプチリシンの結合活性を有していることを示している。

#### 実施例VII

##### 疎水性陽性イオン化可能樹脂の滴定

滴定用の樹脂の試料（1g、湿重量）を、0.1M NaOHで洗浄し、水で濯いだ。続いて試料を9mlの500mM NaCl溶液（または表3に表示）に懸濁し、0.1N HClで滴定した。滴定の数値は、派生化されていない対



照 Perloza について得られた差引き滴定数値により、希釈効果に関して補正された。滴定データを表3に示す。

表3  
滴定データ

| 樹脂                    | 樹脂 pKa | 滴定開始時の<br>非荷電型のpH | 90%荷電時のpH |
|-----------------------|--------|-------------------|-----------|
| PCC DEAPA             | 9.3    | 10.5              | 8.4       |
| P CDI APELホリソ         | 7.1    | 8.9               | 6.2       |
| PCC APイミタゾール          | 6.25   | 8.0               | 4.8       |
| P CDI AMホンスイミタゾール     | 4.8    | 6.75              | 4.0       |
| P CDI 2AMホリソ          | 4.1    | 6.1               | 3.0       |
| P CDI 4AMホリソ          | 4.7    | 7.2               | 3.7       |
| PCC 3AMホリソ            | 4.2    | 7.0               | 3.3       |
| PCC API (10 mM NaCl)  | 5.0    | 8.0               | 3.6       |
| P CDI APM(10 mM NaCl) | 5.8    | 8.05              | 4.8       |
| P CDI AMB(10 mM NaCl) | 3.6    | 6.45              | 3.0*      |
| S ECH メチゾール           | 5.6    | 7.6               | 4.5       |
| S ECH 4-メチカトホリソ       | 5.35   | 7.6               | 4.2       |
| S ECH メルカトホンスイミタゾール   | 4.2    | 6.5-7.0           | 3.1       |

\* 低いpHの値は、酸希釈によるより大きな誤差が生じやすい

#### 実施例IX

##### 疎水性陰性イオン化可能樹脂の滴定

0.5 M NaCl中の樹脂試料(1g)をpH12に、1 M NaOHを用いて調整し、続いてpH3まで0.1 M HClを用いて滴定した。滴定の数値は、派生化されていない対照 Perloza について得られた差引き滴定数値により、希釈効果に関して補正された。滴定データを表4に示す。

表4  
滴定データ

| 樹脂                      | 樹脂 pKa | 滴定開始時の<br>非荷電型のpH | 90%荷電時のpH |
|-------------------------|--------|-------------------|-----------|
| P CDI DAH ニトロヒドロキシフェル酢酸 | 6.4    | 4                 | 7.5       |
| P CDI ニトロソシ/エタノールアミン    | 7.2    | 5                 | 9.0       |
| P CDI DAH シクロオキサリ酸      | 7.2    | 5                 | 9.3       |
| P CDI シアプロモチミン          | 7.7    | 5                 | 9.3       |
| P CDI DAH クロヒドロキシフェル酢酸  | 9.8    | 6.5               | 10.8      |
| P CDI DAH ヒドロキシフェル酢酸    | 10.7   | 7.5               | 11.2      |
| P CDI チラミン              | 10.7   | 7.5               | 11.2      |
| PCC                     | 5.2    | 3.0               | 6.5       |
| PCC (10mM NaCl)         | 6.1    | 3.3               | 7.5       |

表3および4中のデータは、誘導可能な電荷を有する代表的な樹脂が、静電的に荷電していない状態から静電的に荷電している状態へ転換されるpH範囲を示している。このデータは、当業者は、異なったイオン化プロファイルを有する多様な樹脂を選択、調整し、それにより回収されるべき標的タンパク質に対応した樹脂を使用可能とすることができることを示している。

#### 実施例X

##### バッチ結合を用いたスプーチリシンの回収

##### A. API置換Perlozaを用いた回収

1-(3-アミノプロピル)イミダゾール-置換Perloza(MG1)を、オリジナルのマトリックスPerlozaMT100ファイン(Sechez a, Prague, Czechoslovakiaより入手可能)を用いて調製した。調製された樹脂の膨潤容量は、乾燥樹脂gあたり6.8mlであった。用いられた活性化化学反応はカルボニルジイミダゾール-アミノカプロン酸活性化であった。活性化置換は1.55mMカプロン酸基/gであった。用いられたイオン化可能官能基は、1-(3-アミノプロピル)イミダゾールで、カプロン酸のカルボキシル基の95-100%を置換していた。樹脂の構造を図7に示す。

時間および塩のスプーチリシン液体培地のMG1樹脂への結合に対する影響を調べた。高塩条件は0.5M NaClを平衡/洗浄バッファーへ添加することを

含む。低塩条件では余分な塩を有してはいなかった。塩の溶出バッファーへの添加の影響を調べた。実験条件は以下の通りである。

|             | 低塩                                | 高塩   |
|-------------|-----------------------------------|--|
| 平衡化/洗浄バッファー | 50mM グリシン<br>pH 9.1<br>0.8 mmho   | 50mM グリシン/0.5M NaCl<br>pH 9.1<br>48.7 mmho |
| 溶出バッファー     | 50mM 酢酸<br>pH 5.2<br>4.3 mmho     | 50mM 酢酸<br>0.5 M NaCl<br>pH 5.2/52.6 mmho  |
| 再生          | プロピレングリコール/エタノール/0.1 N HCl        |  |
| 液体培地        | 20ミクロンまで濾過された液体培地 pH 9<br>18 mmho |  |

4 gの湿樹脂を、高塩および低塩平衡化バッファーで平衡化し、最終容量10 mlとした。静置された樹脂の容積は、実験の前に記録されていた。

その全体の開示がここに参考文献として取り込まれている1993年10月14日に出版された米国出願第137240号に記載されたように得られたスプチリシン派生体を含む50 mlの培養液体培地を、適当なpHに調整した。時間0において、10 mlのバッファーおよび樹脂を液体培地に添加した。付加的に1 mlの水が試験管の洗浄のために加えられた。混合物は質量がわかっているビーカー中で、冷却下で5分間撹拌した。その時、上清の一部はワットマン47濾紙を有するブフナー漏斗を通して濾過した。0.1 mlの試料を集めた。続いて、上清および樹脂をもう1度、さらに30分間接触させた。

このとき、全ての上清を樹脂から濾過によって分離した。樹脂を平衡化/洗浄バッファーで濯ぎ、続いてビーカー中に戻し、100 mlの洗浄バッファーと接触させ、あらゆる非選択的に結合している成分を除いた。この溶液は再び濾過された。樹脂を続いて100 mlの溶出バッファーと、少なくとも1時間接触させた。

溶出後、樹脂をプロピレングリコールに少なくとも10分間接触させた。これに続いて簡単にエタノールで濯いだ。最後に、樹脂を0.1 M HCl再生バッ

ファーに少なくとも15分間接触させた。

上清および溶出画分の試料の活性を調べた。結合5分後のスプチリシンよりも多量のスプチリシンが35分後の樹脂に結合していた。35分後の結果を表5に示す。

表5  
スプチリシンのMG1バッチ結合

|                   | 低塩     | 高塩     |
|-------------------|--------|--------|
| 樹脂の容積(ml)         | 6.0    | 6.0    |
| 樹脂と接触させた全活性酵素(mg) | 343.99 | 328.50 |
| 全非結合酵素(mg)        | 192.06 | 175.74 |
| 全結合酵素(mg)         | 151.93 | 152.76 |
| 全溶出酵素(mg)         | 19.35  | 62.63  |
| 回収されなかった全酵素(mg)   | 132.58 | 90.13  |
| 樹脂容量(mg/ml)       | 25.32  | 25.46  |

表5のデータはMG1樹脂は高または低イオン強度でほぼ同じ量のスプチリシンを、何れの条件下でも約25mg/mlの容量で結合したことを示している。溶出効率は高塩溶出バッファーのほうが良かった。

#### B. 4AMP置換Perloza(MG2)を用いた回収

4-(アミノメチル)ピリジン-置換Perloza(MG2)を、Perloza MT100ファインのオリジナルのマトリックスを用いて調製した。調製された樹脂の膨潤容量は、乾燥樹脂gあたり6.8mlであった。用いられた活性化化学反応はカルボニルジイミダゾール-アミノカブロン酸活性化であった。活性化置換は1.55mMカブロン酸基/gであった。用いられたイオン化可能官能基は、4-(アミノメチル)ピリジンで、カブロン酸のカルボキシル基の95-100%を置換していた。樹脂の構造を図7に示す。

時間および塩のスプチリシン液体培地のMG2樹脂への結合に対する影響を調べた。高塩条件は0.5M NaClを平衡/洗浄バッファーへ添加することを

含む。低塩条件では余分な塩を有してはいなかった。両方に対して同じ溶出バッファーを用いた。実験条件は以下の通りである。

|               | 低塩                                    | 高塩  |
|---------------|---------------------------------------|---|
| 平衡化／洗浄バッファー   | 50mM トリス<br>pH 7.7<br>3.3 mmho        | 50mM トリス/0.5M NaCl<br>pH 7.7<br>51.2 mmho |
| 溶出バッファー 1 & 2 | 100mM 酢酸<br>pH 5.2<br>8.2 mmho        | 100mM 酢酸<br>pH 5.2<br>8.2 mmho            |
| 再生            | 70%エタノール/0.1 N HCl                    |   |
| 液体培地          | 20ミクロンまで濾過された液体培地 pH 7.7<br>16.8 mmho |   |

試料を第1の溶出バッファーに90分間、第2の溶出バッファーに30分間接触させたことを除いて、上記実施例X-Aの手順に従った。

上清および溶出画分の試料の、全タンパク質量および活性を調べた。35分後の結果を表6に示す。

表6  
スプテリシンのMG2パッチ結合

|                        | 低塩      |        |         | 高塩      |        |         |
|------------------------|---------|--------|---------|---------|--------|---------|
|                        | 全タンパク   | 酵素     | その他     | 全タンパク   | 酵素     | その他     |
| 樹脂と接触させた<br>タンパク質(mg)  | 1552.27 | 431.86 | 1120.40 | 1709.95 | 467.38 | 1242.57 |
| 非結合<br>タンパク質(mg)       | 1092.24 | 219.99 | 872.25  | 990.03  | 213.17 | 776.86  |
| 結合全体(mg)               | 460.02  | 211.87 | 248.16  | 719.92  | 254.21 | 465.71  |
| 溶出 E 1                 | 343.86  | 153.79 | 190.08  | 403.54  | 161.29 | 242.25  |
| 溶出 E 2                 | 26.98   | 11.57  | 15.41   | 18.75   | 12.14  | 6.61    |
| 回収されなかった<br>全タンパク質(mg) | 104.58  | 46.51  | 58.07   | 333.49  | 80.78  | 233.97  |
| 樹脂容量(mg/ml)            | 73.02   | 33.63  | 39.39   | 128.56  | 45.39  | 83.17   |
| 樹脂容積(ml)               | 6.3     |        |         | 5.6     |        |         |

表6のデータはMG2が、低塩下で33mg/ml、高塩下で42mg/mlの活性酵素容量を有していることを示している。全体タンパク容量はそれぞれ73mg/mlおよび129mg/mlで顕著に高いものであった。疎水性結合は高塩濃度で改善されていたが、全体タンパク質の約30%、および恒的タンパク質の約50%が低塩濃度条件で結合していた。溶出はMG1よりも効率的で、第2の溶出によって多くの追加のスプチリシンは除去されなかった。

#### 実施例XI

アミノメチルビリジン置換Perloza (MG2)を用いたスプチリシンの回収

##### A. 50mlの放射状流体カラムを用いた回収

Perloza MT100ファイン再生セルロースマトリックス (Secheza, Prague, Czechoslovakia) をCDIにより実施例

VIに従って活性化した。それを、イオン化可能官能基としての4-アミノメチルビリジンで、アミノカプロン酸スパーサーアームを用いて置換した。調製された樹脂の膨潤体積は6.8ml/g乾燥樹脂であった。イオン化可能官能基による置換は、利用可能なカプロン酸カルボキシル基の95-100%であった。樹脂の構造を図7に示す。

50mlの放射状流体クロマトグラフィーカラム (Sepragen Corp., San Leandro, California) を上記の樹脂で充填し、Genencor International, Inc., South San Francisco, Californiaより市販されているPURAFECT (登録商標) スプチリシンを回収するために、以下のように用いた。

##### 液体培地処理:

全体の液体培地を冷凍Sorvall遠心で4500rpmで45分間遠心した。centrateの伝導率は調整せず、希釈もしなかった。10ミクロン以上の粒子を除いたのは尹過である。液体培地のpHを調整はしなかった(それはすでに7.6であった)。液体培地の伝導率は16mmhoであった。液体培地は8.9mg/mlの活性タンパク質をいくつかの混在タンパク質とともに有し

ていた。

バッファー類：

平衡化バッファー：50 mM TRIS（登録商標）；pH 7.8；+ NaCl を 17 mmh<sub>0</sub>まで

洗浄バッファー：50 mM TRIS（登録商標）；pH 7.8；+ NaCl を 17 mmh<sub>0</sub>まで

溶出バッファー：25 mM 酢酸、40%プロピレングリコール、8%乳酸ナトリウム、pH 5.2、30 mmh<sub>0</sub>

再生バッファー：0.1 N 塩酸、pH 1.9、30 mmh<sub>0</sub>

遠心した培地（251 ml）を pH 7.8、伝導率 16-18 mmh<sub>0</sub>（0.15-0.18 M の NaCl 濃度に相当）でカラムに充填した。流速は 10 ml / 分でであった。スプチリシンは荷電していない樹脂に結合し、樹脂/タンパク質複合体を形成した。カラムを 25 カラム容量分を 15 ml / 分で洗浄し、15 カ

ラム容量分を 5 ml / 分で溶出した。流体通過画分には最小の活性が検出され、93%のスプチリシンが樹脂と複合体を形成した。42%の結合酵素が洗浄中に失われた。実行の間を通して圧力は 10 psi 以下であった。

上記の溶出バッファーを用いて、pH を減少させ伝導率を増加させることにより、複合体を破壊し酵素を溶出させた。91%の結合酵素を回収した。最大画分濃度は 12.8 mg / ml であり、90%の回収酵素が 4 CV までに溶出された。洗浄による損失のため、全体での回収率は 48.6%であった。活性酵素の全体のタンパク質に対する比率は、最も濃縮された溶出画分は最初よりも 15-25%純粋であることを示していた。

#### B. 3. 5 ml 柱流体カラム中の回収

3.5 ml 柱流体クロマトグラフィーカラム（ファルマシア）を、同じ樹脂で充填し、同様の液体培地からスプチリシンを回収するために、異なった液体培地処理および異なったバッファーを用いて使用した。

液体培地処理：

全体の液体培地を冷凍 Sorvall 遠心で 4500 rpm で 45 分間遠心し

た。centrateの伝導率は調整せず、希釈もしなかった。10ミクロン以上の粒子を除くために濾過した。液体培地のpHを調整はしなかった（それはすでに7.6であった）。液体培地の伝導率は14mmhoであった。液体培地は9.8mg/mlの活性タンパク質をいくつかの混在タンパク質とともに有していた。

バッファー類：

平衡化バッファー：50mM TRIS（登録商標）+NaClを14mmhoまで；pH7.6

洗浄バッファー：50mM TRIS（登録商標）+NaClを14mmhoまで；pH7.6

溶出バッファー：25mM 酢酸、40%プロピレングリコール、0.8%ギ酸ナトリウム、pH5.2、5mmho

再生バッファー：0.1N 塩酸

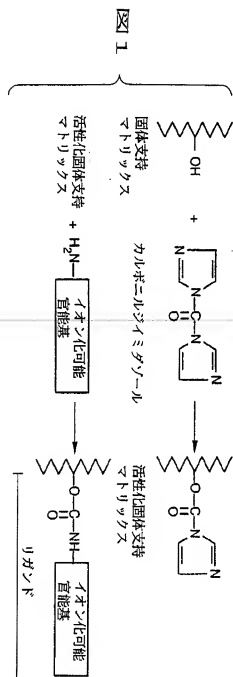
液体培地centrate（14.4ml）をpH7.6、伝導率14mmho（0.13MのNaCl濃度に相当）でカラムに充填した。流速は0.85CV/分であった。スプチリシンは荷電していない樹脂に結合し、樹脂/タンパク質複合体を形成した。カラムを155カラム容量分だけ洗浄し、93カラム容量分だけ溶出させた。流体通過画分には活性は検出されなかった。故に、全てのスプチリシンが樹脂と複合体を形成した。32%の結合酵素が非常に長い洗浄中に失われた。実行の間を通して圧力は15psi以下であった。

上記の溶出バッファー（0.03MのNaCl濃度に相当）を用いて、pHを減少させることにより、複合体を破壊し酵素を溶出させた。86%の結合酵素を回収した。洗浄による損失を含めた全体での回収率は58%であった。

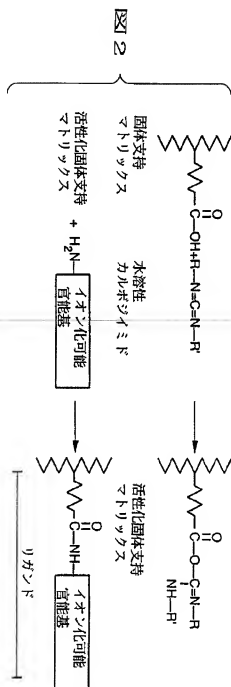
当業者にとって、本発明の精神から離れることなく、明らかな性質の様々な変化および改変を行い得ること、およびそのような改変が、以下に示されたクレーム同様本発明の範囲に含まれることは明らかである。



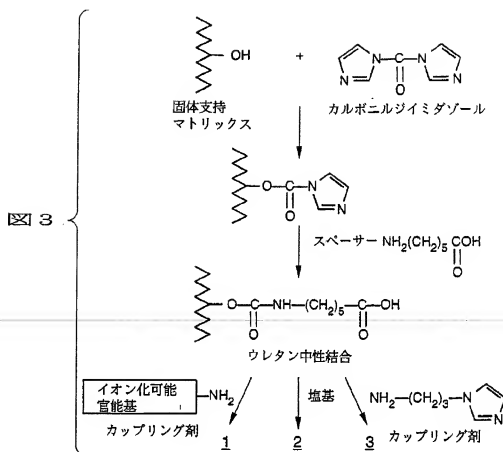
【 図 1 】



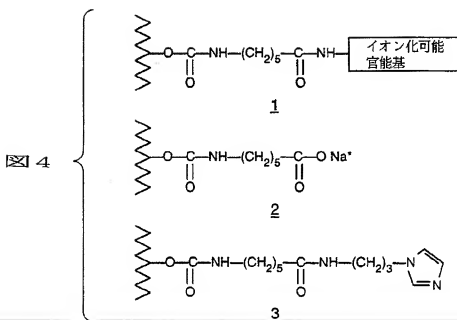
【図2】



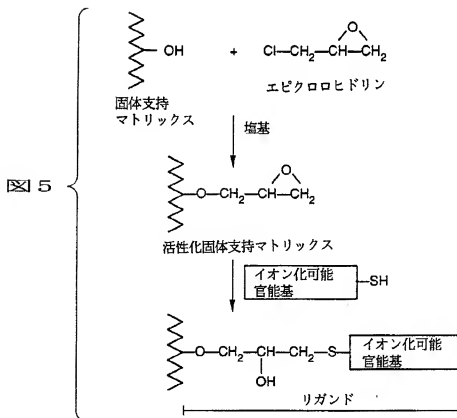
【図3】



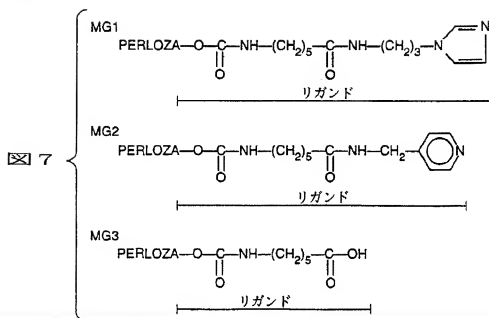
【図4】



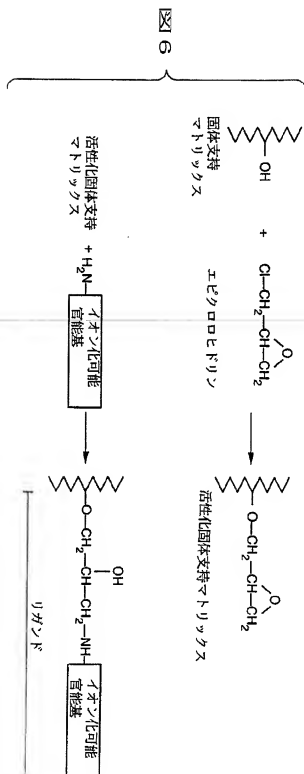
【図5】



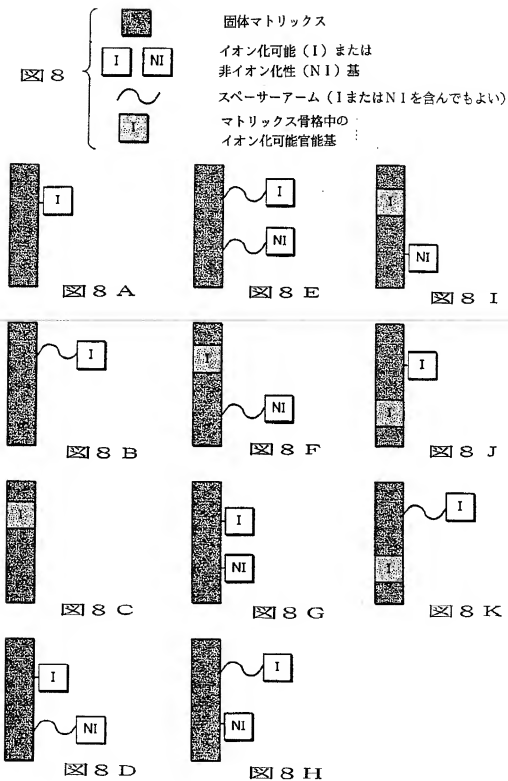
【図7】



【図6】



【図8】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|  |  |  |
|--|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 6 C07K1/16 B01D15/08 G01N30/48 B01J20/28   |  | Inventor and Application No.<br>PCT/IB 95/00598                  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 6 C07K B01D B01J G01N  |  |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched   |  |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)   |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |  |
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage  | Relevant to claim No.  |
| X  | J. CHROMATOGR.,<br>vol. 510, 1990<br>pages 149-154,<br>KASCHE, V. ET AL. 'Rapid protein<br>purification using<br>phenylbutylamine-Eupergit: ...'<br>cited in the application<br>"abstract"<br>---<br>--- | 1-54   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.   |  |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |  |
| * Later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.<br>"A" document member of the same patent family |  |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>19 October 1995   |  | Date of mailing of the international search report<br>24. 10. 95 |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.O. 5814 Paludarium 2<br>NL - 2180 PB Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 540-5040, Tlx. 31 651 epo nl,<br>Fax (+31-70) 540-3016   |  | Authorized officer<br>Hermann, R                                 |



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.  
PCT/IB 95/00598

| C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| Category *  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| X   | BIOCHEM. J.,<br>vol. 151, 1975<br>pages 281-290,<br>YON, R.J. & SIMMONDS, R.J. 'Some<br>properties of N-(3<br>carboxypropionyl)aminodecyl-sepharose and<br>its interaction with wheat-germ aspartate<br>transcarbamoylase'<br>cited in the application<br>* page 281, introduction *<br>---- | 1-54                  |
| X   | J. BIOCHEM.,<br>vol. 91, 1982<br>pages 1555-1561,<br>SASAKI ET AL. 'Hydrophobic-ionic<br>chromatography: ...'<br>cited in the application<br>* abstract *<br>----  | 1-54                  |
| X   | J. BIOCHEM.,<br>vol. 86, 1979<br>pages 1537-1548,<br>SASAKI, I. ET AL. 'Hydrophobic-ionic<br>chromatography'<br>cited in the application<br>* abstract *<br>----   | 1-54                  |
| A   | ANAL. BIOCHEM.,<br>vol. 151, 1985<br>pages 526-533,<br>BISCHOFF, R. & MCLAUGHLIN, L. W.<br>'Isolation of specific tRNAs using an<br>ionic-hydrophobic mixed-mode<br>chromatographic matrix'<br>-----   |                       |

## フロントページの続き

|                          |                       |         |         |       |
|--------------------------|-----------------------|---------|---------|-------|
| (51)Int.Cl. <sup>6</sup> | 識別記号                  | 庁内整理番号  | F I     |       |
| G O I N                  | 30/48                 | 0275-2J | G O I N | 30/48 |
|                          | 30/88                 | 0275-2J |         | 30/88 |
| (72)発明者                  | ベッカー, ナザニエル トッド       |         |         | T     |
|                          | アメリカ合衆国 カリフォルニア州      |         |         | J     |
|                          | 94080 サウス サン フランシスコ キ |         |         |       |
|                          | ンボル ウェイ 180 ジェネンコア イ  |         |         |       |
|                          | ンターナショナル インコーポレーテッド   |         |         |       |
|                          | 内                     |         |         |       |
| (72)発明者                  | ビルサイス, ベン エイ          |         |         |       |
|                          | アメリカ合衆国 カリフォルニア州      |         |         |       |
|                          | 94080 サウス サン フランシスコ キ |         |         |       |
|                          | ンボル ウェイ 180 ジェネンコア イ  |         |         |       |
|                          | ンターナショナル インコーポレーテッド   |         |         |       |
|                          | 内                     |         |         |       |
| (72)発明者                  | スディール, ランドン エム        |         |         |       |
|                          | アメリカ合衆国 カリフォルニア州      |         |         |       |
|                          | 94080 サウス サン フランシスコ キ |         |         |       |
|                          | ンボル ウェイ 180 ジェネンコア イ  |         |         |       |
|                          | ンターナショナル インコーポレーテッド   |         |         |       |
|                          | 内                     |         |         |       |